

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**PREVALÊNCIA DE *Mycoplasma synoviae* EM FRANGOS E ESTUDO
COMPARATIVO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

Inês Pires Pedrosa

Orientador:

Professor Doutor Paulo Manuel Rodrigues Martins da Costa

Co-Orientador:

Médico Veterinário Fernando Alberto Campos Moreira

Porto 2014

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**PREVALÊNCIA DE *Mycoplasma synoviae* EM FRANGOS E ESTUDO
COMPARATIVO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

Inês Pires Pedrosa

Orientador:

Professor Doutor Paulo Manuel Rodrigues Martins da Costa

Co-Orientador:

Médico Veterinário Fernando Alberto Campos Moreira

Porto 2014

Lista de figuras

Figura 1 – Pavilhão com galinhas e galos de reprodução (a), com *slats*, ninhos (b) e sistema automático de recolha de ovos (c).

Figura 2 – Receção de pintos para produção de frango (100 pintos/caixa) (a; b) em pavilhão com cama de casca de arroz (c).

Figura 3 – Pavilhões de produção de frango (*Cobb* e/ou *Ross*). Pintos com um (a) e 12 (b) dias de vida e frangos com 38 dias de vida (c).

Figura 4 – Pavilhões de frango (a) e galinhas reprodutoras (b, c) do campo (*Redbro Cou Nu*).

Figura 5 – Bando de frangos do campo com tumefações nas articulações do tarso, compatíveis com infeção por *M. synoviae*.

Figura 6 – Frango com pericardite (a) e aerossaculite com fibrina (b), compatível com fase avançada de infeção por *M. synoviae*.

Figura 7 – Frango do campo com tumefação da articulação do tarso (a) e sinovite (b), ambos compatíveis com infeção por *M. synoviae*.

Figura 8 – Frango com lesões compatíveis com infeção por *M. synoviae*. a - hipertrofia renal; b – ovarite; c - esplenomegalia.

Figura 9 – Colónias de micoplasma em forma de ovo estrelado (Corporation, s.d.).

Lista de tabelas

Tabela 1 – Resultados de testes de diagnóstico para *M. synoviae* em galinhas reprodutoras. Pos.- positivo; neg.- negativo.

Tabela 2 – Grupos de bandos de frangos e testes de diagnósticos realizados no ensaio.

Tabela 3 – Amostras e locais de recolha para os testes de diagnóstico para *M. synoviae*.

Tabela 4 – Resultados da cultura e teste ELISA para *M. synoviae* do grupo de bandos de frangos A. Pos.- positivo; neg.- negativo; s.i.- sem informação; (1)- pavilhão 1; (2)- pavilhão 2; *- entrega tardia da amostra, amostra possivelmente danificada.

Tabela 5 – Resultados do teste ELISA para *M. synoviae* do grupo de bandos de frangos B. Neg.- negativo.

Tabela 6 – Resultados do teste PCR para *M. synoviae* do grupo de bandos de frangos C. Pos.- positivo; neg.- negativo; s.i.- sem informação.

Tabela 7 – Comparação dos resultados dos frangos e das reprodutoras. Pos.- positivo; neg.- negativo; s.i.- sem informação; (1)- pavilhão 1; (2)- pavilhão 2; *- entrega tardia da amostra, amostra possivelmente danificada.

Tabela I – Sobrevivência de *M. synoviae* em diferentes materiais (Bradbury, s.d.; Abolnik & Gouws, 2014; Marois, et al., 2000).

Tabela II – Ordem de suscetibilidade de vias de infeção e o período de incubação correspondente, de aves infetadas experimentalmente por inoculação, entre as 3 e 6 semanas de idade, com exsudado de articulações de aves infetadas ou gema de embriões infetados (Kleven, 2003).

Tabela III – Informações dos frangos testados. S.i.- sem informação.

Tabela IV – Informações do abate dos frangos. S.i.- sem informação; (1)- pavilhão 1; (2)- pavilhão; *- média de todos os abates.

Lista de abreviaturas e acrónimos

% – Percentagem

ADN – Ácido desoxirribonucleico

APMV-1 – Paramixovírus aviário

Célula NK – Célula *Natural Killer*

cm – Centímetros

DAP – Dermatite das almofadas plantares

E. coli – *Escherichia coli*

e.g. – *exempli gratia*

E.U.A. – Estados Unidos da América

EAA (*eggshell apex abnormality*) – anormalidades no ápice da casca do ovo

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

Et al. – *et alii*

G+C – Guanina + Citosina

GP – *Grand Parents*

HI – Inibição da hemoaglutinação

I.C. – Índice de conversão

Ig – Imunoglobulina

kb – Kilobase

km – Quilómetros

M. gallisepticum – *Mycoplasma gallisepticum*

M. synoviae – *Mycoplasma synoviae*

Ma5 e 4/19 – Estirpes *Massachusetts* 5 e 4/19 do vírus da bronquite infecciosa

NAD – Dinucleótico de nicotinamida e adenina

neg. – Negativo

° – Graus

° C – Graus Celsius

OIE (*World Organisation for Animal Health*)
– Organização Mundial da Saúde Animal

ORT - *Ornithobacterium rhinotracheale*

p.i. – Pós infecção

PCR (*Polymerase chain reaction*) – Reação
em cadeia da polimerase

pH – Potencial de hidrogénio

PM – Peso médio

pos. – Positivo

PPLO (*Pleuropneumonia-like-organisms*) -
Organismos semelhantes aos da
pleuropneumonia

Raios UV – Raios Ultravioleta

RAPD – *Random amplified polymorphic
DNA*

RFLP – *Restriction fragment length
polymorphism*

RNA – Ácido ribonucleico

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

S.A. – Sociedade anónima

S.C. – Sinais clínicos

s.d. – Sem data

s.i. – Sem informação

SPA – Aglutinação em placa de soro

spp. – Espécies

TMA – Taxa de mortalidade acumulada

Definições

All-in all-out / “Tudo dentro, tudo fora”: Prática de povoamento de instalações pecuárias que se caracteriza pela introdução e pela recolha de todos os animais em simultâneo ou em intervalos de tempo bastante limitados, possibilitando que os espaços (pavilhões) possam permanecer “vazios” por um determinado período.

Ante-mortem: Antes da occisão ou abate.

in vitro: Processos biológicos ensaiados fora dos sistemas vivos, num ambiente controlado e fechado num laboratório.

Post-mortem: Depois da occisão ou abate.

Primers: Segmentos de ácidos nucleicos utilizados para o início da replicação do ADN.

Slats – Tipo de piso com ripas de plástico.

Sui generis / “do seu género próprio”: Para indicar que algo é único e peculiar.

Vacina MS-H: Vacina viva atenuada e termossensível contra *Mycoplasma synoviae* da estirpe MS-H.

Resumo

Mycoplasma synoviae é considerado um importante agente patogénico em galinhas que, embora possa ser clinicamente “silencioso”, continua a ser uma preocupação prioritária na avicultura industrial. Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi fazer um estudo comparativo entre a presença *M. synoviae* em frangos e a prevalência do agente nas suas progenitoras, de modo a verificar a ocorrência de transmissão vertical do mesmo.

Foram avaliadas amostras provenientes de 34 bandos de frangos, com e sem sinais clínicos, e lesões compatíveis com infeção por *M. Synoviae* através de cultura, ELISA e PCR. Os resultados revelaram-se todos negativos, com exceção de um teste de ELISA de um bando que, possivelmente, seria um falso positivo. Os nossos resultados sugeriram que os frangos estavam livres de *M. synoviae* e, por isso, as causas dos sinais clínicos poderiam ser atribuídas a outros agentes infecciosos. Por outro lado, em virtude da idade dos frangos (< 47 dias), dos tratamentos com antibióticos aplicados (cujo espectro de atividade inclui o *M. synoviae*) ou da eventual presença de estripes atenuadas ou modificadas de *M. synoviae*, não é possível descartar a possibilidade dos resultados serem falso negativos.

Contudo, futuros estudos que se possam vir a realizar com igual objetivo devem fazer uma abordagem mais criteriosa de todos os fatores que possam criar falso negativos, de maneira a credibilizar os resultados. Também é importante a pesquisa de diferentes estirpes de *M. synoviae*, assim como o uso de marcadores para detetar a eventual presença intracelular deste agente e identificar novos agentes patogénicos que possam causar os mesmos ou idênticos sinais clínicos do *M. synoviae*, como é o caso de *Ornithobacterium rhinotracheale*.

PALAVRAS CHAVE: *Mycoplasma synoviae*, transmissão vertical, bandos de frangos

Abstract

Mycoplasma synoviae is considered an important pathogen of chickens, although it may be clinically "silent" it remains a priority concern in the poultry industry. In this context, the main objective of this study was to make a relation between the presence of *M. synoviae* in chickens and the prevalence of the agent in its progenitors, in order to verify the occurrence of vertical transmission.

Thirty four samples were taken from flocks of chickens with and without clinical signs and lesions consistent with *M. synoviae* infection. The samples were evaluated by culture, PCR and ELISA for detection of *M. synoviae*. The results were all negative, except for one ELISA test of a flock which may possibly be a false positive. The results suggested that all the flocks were free of *M. synoviae* and, therefore, the clinical signs observed among chickens might be attributed to other infectious agents. Moreover, due to the early age of the chickens (<47 days), the applied antibiotic treatment which includes the spectrum of activity *M. synoviae* and the potential presence of any modified or attenuated strain of *M. synoviae*, it was not possible to rule out the possibility of false negative results.

In order to give credibility to the results, future similar studies should be performed in order to evaluate and discuss the factors that can lead to false negative results. It is also important to include in those studies the research of different strains of *M. synoviae* as well as markers to detect the presence of intracellular agents and also identify new agents and pathogens that cause the same or similar clinical signs of *M. synoviae*, such as of *Ornithobacterium rhinotracheale*.

KEYWORDS: *Mycoplasma synoviae*, vertical transmission, chickens flocks

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração e a boa vontade daqueles a que agora me refiro. A todos os meus sinceros agradecimentos.

Ao Professor Doutor Paulo Costa pela confiança, simplicidade e otimismo, que me ajudou a crescer profissionalmente, através dos muitos ensinamentos que me transmitiu.

Ao Dr. Fernando Moreira pela disponibilidade, interesse, receptividade e que tão amavelmente me orientou.

Ao Dr. Luís Ferreira por ter estado sempre presente e prestável, pela paciência, generosidade e amizade que se criou.

Ao Dr. André Leite pela boa disposição, pelo tempo despendido e partilha de conhecimentos.

Aos Engenheiros, André Sousa, Sandra Bom, João Borges, Tiago Correia e Henrique Pires, pela simpatia, boa disposição e apoio prestado.

À Natália pela disponibilidade e pela pronta colaboração.

Ao Engenheiro José Loureiro pelo apoio técnico prestado.

Ao Sr. Avelino Gaspar e à Sra. Susana pela oportunidade que me foi concedida de realizar o estágio curricular numa organização prestigiada e de grande dimensão como a Lusiaves.

À minha família, em especial à minha mãe que tornou possível o meu percurso académico e que me tem apoiado durante toda a vida.

Às minhas grandes amigas, Diana, Sara e Joanna, pelo carinho e apoio incondicional.

Aos amigos que fiz na faculdade, em especial à Ana Ágata, Ana Pacheco, Inês Borges, Inês Palhinhas e Mariana Pacheco, que me proporcionaram bons momentos ao longo da minha vida académica.

Índice

LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS	IV
DEFINIÇÕES.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT	VII
AGRADECIMENTOS.....	VIII
OBJETIVOS GERAIS	X
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	X
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	XII
1. ETIOLOGIA.....	1
2. HOSPEDEIROS	1
3. TRANSMISSÃO	2
4. PATOGÉNESE	3
4.1. Período de incubação	4
5. SINAIS CLÍNICOS EM FRANGOS	4
6. LESÕES <i>POST MORTEM</i>	6
6.1. Lesões patológicas macroscópicas	6
6.2. Lesões patológicas microscópicas	6
7. DIAGNÓSTICO	7
7.1. Cultura	7
7.2. Testes serológicos	8
7.3. Testes de biologia moleculares	10
7.4. Diagnósticos diferenciais.....	12
8. PREVENÇÃO E CONTROLO	12
8.1. Tratamento com antibióticos	14
8.2. Vacinação	15
MATERIAL E MÉTODOS	XIII
RESULTADOS	XVI
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	XIX
BIBLIOGRAFIA.....	XXIV
APÊNDICES.....	XXVII

Objetivos gerais

Nos últimos anos, a produção avícola sofreu um grande crescimento e como consequência granjeou um papel cada vez mais relevante no plano económico. Estes atributos despertaram o meu interesse pela área e motivaram-me a realizar o estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, em avicultura, mais especificamente na vertente sanitária associada à produção de frango. O cumprimento de tal vontade teve acolhimento na empresa Lusiaves Indústria e Comércio Agro-Alimentar, S.A., Leiria (Portugal), um grupo económico apostado numa estratégia de verticalização, possuindo atividades desde a recria de galinhas reprodutoras, produção de ovos para incubação e produção de pintos, produção de frango, produção de “frango do campo” e peru, abate de aves e a transformação, distribuição e comercialização de produtos alimentares. Entre 17 de outubro de 2013 e 6 de fevereiro de 2014, tive o privilégio de ter sido orientada pelo Dr. Fernando Moreira, tendo-me sido dada a oportunidade de conhecer diversas áreas da avicultura, nomeadamente:

- Um centro de incubação composto por 48 incubadoras de carga única e 36 eclosoras, tendo a capacidade de produzir dois milhões de pintos por semana, tendo participado no acompanhamento e na avaliação periódica dos ovos incubados;
- Um centro de abate com uma capacidade de abate de 8500 frangos por hora articulado com i) uma linha de desmancha automática com capacidade para 6000 frangos por hora, ii) uma sala de preparação e desossa automática de carne de aves e iii) produção de preparados de carne, picados, marinados e panados. Neste centro acompanhei o Dr. Luís Ferreira nas avaliações mensais de cargas de frango;
- Diversas explorações avícolas de recria de reprodutoras, reprodutoras (Figura 1) e de produção de frangos (Figuras 2 e 3) equipadas com as mais recentes tecnologias, permitindo um melhor controlo do processo da produção.

Foi também possível acompanhar as rotinas de Engenheiros Zootécnicos responsáveis por determinadas explorações de produção própria e integradas e acompanhar o Dr. André Leite, Médico Veterinário responsável pela zona norte do país, tendo tido a oportunidade de conhecer a produção de frango do campo (Figura 4).

Objetivos específicos

Nos últimos anos as infeções por *M. synoviae* na produção de frangos têm despertado a atenção dos serviços sanitários, revelando-se uma doença emergente que, sendo muitas vezes silenciosa, continua a ser uma preocupação primária na avicultura industrial. Portanto, neste

trabalho o principal objetivo foi estudar e verificar a presença de infecção por *M. synoviae* em frangos, de modo a verificar a transmissão vertical deste agente, recorrendo a diferentes métodos laboratoriais de diagnóstico e comparar os seus resultados com a presença de *M. synoviae* nas reprodutoras correspondentes.

Revisão Bibliográfica

Ao longo do tempo, as aves domésticas têm proporcionado ao homem companhia, ovos, carne e penas. Além disso, diversas espécies de aves têm também contribuído para realização de feiras e espetáculos. Uma das aves domésticas com maior relevância para a nossa civilização é a galinha (*Gallus gallus domesticus*). O seu papel na alimentação do Homem impulsionou uma vasta indústria de criação intensiva de galinhas e frangos, que proporcionou a produção em larga escala e a um custo muito competitivo de ovos e carne (Nagwa, et al., 2013), reconhecidos igualmente pela sua excelente qualidade nutricional (Buim, et al., 2009).

Nas últimas décadas, o grande crescimento mundial da avicultura (bandos e densidades maiores) e a modernização da avicultura (sistemas intensivos) tornaram claro e evidente a necessidade de uma maior, e mais especializada, atenção à saúde dos bandos de aves. Havendo uma situação ideal para a multiplicação, disseminação e perpetuação de vários agentes patogénicos nas aves e a ocorrência de surtos de doenças que acarretam elevados prejuízos económicos (Sesti, s.d.), cabe ao médico veterinário a prevenção das doenças e a saúde do bando, assim como a promoção da qualidade e segurança alimentar, além da gestão económica deste tipo de explorações, do bem-estar animal e do impacto ambiental.

Atualmente *Mycoplasma spp.* é um importante agente patogénico das aves. Existem várias espécies de micoplasmas em humanos, animais, plantas e insetos, sendo a sua distribuição mundial (Kleven, 2003). A micoplasmose aviária foi descrita pela primeira vez em perus em 1926 e em galinhas em 1936 (Nascimento, et al., 2005). *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma gallisepticum* são as duas espécies patogénicas mais comuns em aves domésticas, tendo um impacto económico em reprodutoras, frangos e poedeiras (Jarquin & Hanning, 2012), sendo responsáveis por patologias incluídas na lista da OIE (OIE, 2013). Outros micoplasmas, como *Mycoplasma meleagridis* e *Mycoplasma iowae*, também podem causar doença em aves domésticas, incluindo nos perus, apesar de *Mycoplasma meleagridis* não infetar galinhas (Nascimento, et al., 2005). Nas décadas de 50 e 60, foi descrito pela primeira vez uma infeção com *M. synoviae*, associada a problemas articulares observados em bandos de frangos. No entanto, só em meados da década de 70, o agente foi descrito e a patologia considerada uma doença (Nascimento, et al., 2005). A infeção por *M. synoviae* é também conhecida como sinovite, sinovite infecciosa ou aerossaculite silenciosa (Butcher, et al., 2009).

1. Etiologia

Mycoplasma spp. pertence à classe *Mollicutes*, ordem *Mycoplasmatales* e família *Mycoplasmataceae* (Jarquin & Hanning, 2012). O gênero *Mycoplasma*, tem mais de 100 espécies (Kleven, 2003), no entanto, pelo menos 20 espécies infetam aves (Nagwa, et al., 2013), como é o caso do *M. gallisepticum*, *M. meleagridis*, *M. synoviae*, *M. iowae*, *M. imitans*, *M. gallinarum*, *M. pullorum*, entre outros. Análises filogenéticas do gene 16s do ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) são usadas para analisar as relações genéticas entre diferentes espécies de micoplasma (Kleven, 2003). *Mycoplasma spp.* pertence ao grupo PPLO (*Pleuropneumonia-like-organisms*), uma vez que o primeiro agente similar encontrado em 1898 foi o da pleuropneumonia contagiosa dos bovinos (BCPP) em 1898 (Nascimento, et al., 2005).

Este agente é uma pseudo bactéria procariota, sem parede celular, que no entanto possui uma membrana celular. Além disso, necessita de colesterol e uma temperatura ideal de 37°C para crescer. O seu ácido desoxirribonucleico (ADN) contém a porção G+C em 23-40% e o tamanho do genoma é bastante pequeno (600-1350 kb), sendo a principal causa da sua reduzida capacidade de metabolismo (Kleven, 2003; Jarquin & Hanning, 2012). Esta última característica revela a sua dependência ao hospedeiro para cobrir as suas necessidades nutricionais (Bradbury, s.d.). Apesar disso, *Mycoplasma spp.* tem vindo a ser considerado um agente extracelular, mas alguns cientistas têm vindo a admitir que alguns deles são parasitas intracelulares obrigatórios, enquanto outros defendem que são organismos intracelulares facultativos (Nascimento, et al., 2005).

Mycoplasma spp. é capaz de produzir variações significativas dos seus importantes antigénios de superfície. Estas propriedades são responsáveis pela capacidade desta bactéria evitar os mecanismos de defesa do hospedeiro e explicam a sua persistência durante largos períodos de tempo (Bradbury, s.d.).

2. Hospedeiros

Mycoplasma spp. é um microrganismo predominantemente “hospedeiro específico”, havendo porém algumas exceções (Nascimento, et al., 2005). Os hospedeiros naturais de *M. synoviae* incluem as galinhas e os perus (Nagwa, et al., 2013), no entanto podem ser encontradas infeções naturais em patos, gansos, pombos, codorniz japonesa e perdiz vermelha. Outros estudos revelaram que, por inoculação artificial, os faisões, gansos, patos e periquitos são suscetíveis a *M. synoviae*.

3. Transmissão

A transmissão de *M. synoviae* pode ocorrer tanto de forma vertical como horizontal (Marois, et al., 2005), no entanto, como o risco de transmissão vertical é minimizada pelo controlo das galinhas reprodutoras, a transmissão horizontal é considerada a mais importante (Feberwee, et al., 2008; Seifi & Shirzad, 2012).

A transmissão vertical (através do ovo) de *M. synoviae* tem um papel preponderante, contudo, muitos bandos nascidos de mães infetadas permanecem livres da infeção (Kleven, 2003). Estudos revelaram que a transmissão vertical a partir de galinhas infetadas possui um pico de transmissão entre as 4 e 6 semanas pós infeção (p.i.) (Cobb, 2011).

A transmissão horizontal de *M. synoviae* pode ocorrer por contacto direto (proporcionando uma disseminação rápida e elevada), ou por contato indireto, através de pessoas, aves selvagens e água de bebida, que poderá ter um papel preponderante na iniciação de um surto de *M. synoviae*, pela possível persistência de micoplasma no ambiente (Marois, et al., 2000). Contudo, a taxa de sobrevivência de micoplasma no ambiente pode ser facilmente reduzida através dos desinfetantes habitualmente usados (Bradbury, s.d.).

Relativamente à transmissão horizontal, esta foi já demonstrada dentro de um lote de frangos e entre lotes de frangos (Bradbury, s.d.). Na incubação, a transmissão pode também ocorrer através dos organismos que sobrevivem na gema do ovo e pelo manuseio das aves durante a sexagem ou a vacinação. Dentro de um mesmo lote de aves em produção a velocidade de transmissão depende de múltiplos fatores, tais como a densidade de alojamento e o tipo de construção do pavilhão. Assume-se que as descargas nasais, espirros e tosse sejam materiais infetantes muito relevantes. Alguns fatores condicionantes podem exacerbar a infeção, tais como o alto nível de amoníaco ambiental, infeções respiratórias intercorrentes ou o stress associado a uma produção intensiva (Bradbury, s.d.). A propagação entre baterias também pode ocorrer dentro do mesmo pavilhão de galinhas (Kleven, 2003). O homem é considerado um portador de micoplasma que pode infetar os lotes (Tabela I). Um estudo revelou ainda uma associação positiva entre o risco de infeção por *M. synoviae* entre aviários de reprodutoras separados por uma distância inferior a 2 km e entre aviários de frangos a menos de 3 km (Bradbury, s.d.). A transmissão acaba por ser rápida dentro e entre os pavilhões de uma granja (McMullin, 2004). A introdução de novos machos num lote de reprodutoras (*spiking*) também já foi identificada como causa de numerosas infeções por *M. synoviae* (Bradbury, s.d.).

A transmissão horizontal de *M. synoviae* ocorre mais rapidamente que a transmissão de *M. gallisepticum*, no entanto, são desconhecidas as causas desta diferença. Contudo, têm vindo a

ser descritos casos em que *M. synoviae* se propagou muito lentamente (Kleven, 2003; Bradbury, s.d.).

4. Patogénese

Mycoplasma infeta o trato respiratório, aderindo à superfície das células epiteliais ciliares da traqueia, colonizando-as e provocando a sua lesão. Esta destruição celular resulta numa falha do movimento do muco ao longo da traqueia, deixando este mecanismo de defesa inespecífica de ser eficiente na expulsão de bactérias do trato respiratório. Durante esta ligação à superfície das células hospedeiras pode ocorrer interferência com os recetores da membrana ou alteração dos mecanismos de transporte. Uma teoria recente baseia-se na permanente ligação à superfície das células epiteliais sem que haja invasão significativa (Jarquin & Hanning, 2012). Deste modo, a maioria das espécies de micoplasma são não-invasivas, no entanto, algumas espécies como *M. gallisepticum* têm a capacidade de penetrar nas células (Kleven, 2003), apresentando uma localização intracelular, que poderá explicar a falta de eficácia dos tratamentos com antibióticos (Bradbury, s.d.).

Para que *M. synoviae* sobreviva no organismo do hospedeiro é necessária uma invasão ao sistema imunitário do hospedeiro, usando ferramentas e mecanismos de patogenicidade (Nascimento, et al., 2005). A patogenicidade envolve a ligação e colonização no trato respiratório superior e outros fatores, nomeadamente a ocorrência de apoptose, danos nas células vizinhas das células alvo de micoplasma, mimetismo molecular (antigénio) que pode levar a uma tolerância para as células B e T e a produção de subprodutos de micoplasma, como o peróxido de hidrogénio e radicais de superóxido (Kleven, 2003). Para além disso, micoplasma tem a capacidade de estimular macrófagos, monócitos, células T auxiliares e células *Natural Killer* (NK), resultando na produção de substâncias como o fator de necrose tumoral (TNF- α), as interleucinas (IL-1,2,6) e os interferões (α , β , γ). Estes mecanismos podem explicar a supressão transitória da resposta imune humoral e celular durante a infeção por micoplasma nas aves e doenças autoimunes, como um infiltrado massivo de células linfóides no trato respiratório e infeção de tecidos das articulações das aves (Nascimento, et al., 2005).

M. synoviae pode ainda ficar num estado de latência, em que não é reconhecido pelo sistema imunitário do hospedeiro, induzindo à doença depois de o hospedeiro ser infetado por outros agentes causadores de doenças e/ou após um episódio de imunodepressão (Nascimento, et al., 2005).

Estudos realizados em embriões de pintos têm vindo a revelar a existência de uma significativa variabilidade na virulência das diferentes estirpes. A passagem de *M. synoviae* em embriões, cultura de tecidos ou líquidos reduz a capacidade de produzir a infeção típica, verificando-se que a passagem no embrião parece ter menos efeito de patogenicidade do que a passagem em líquido (Kleven, 2003).

4.1. Período de incubação

O período de incubação de *M. synoviae* depende dos títulos e patogenicidade do inoculado (Kleven, 2003), da via de infeção (Tabela II), da suscetibilidade da espécie e da presença de fatores de risco (Silva, 2011).

M. synoviae tem um longo período de incubação de 11 a 21 dias (McMullin, 2004). Contudo, já foi observada sinovite infecciosa em frangos com 6 dias de idade, sugerindo que o período de incubação pode ser relativamente curto em aves infetadas através do ovo. (Kleven, 2003).

5. Sinais clínicos em frangos

Nos frangos e galinhas, a infeção por *M. synoviae* afeta predominantemente o aparelho respiratório superior, podendo variar entre uma forma subclínica e severa (Aras & Sayin, 2014). Em alguns casos aparecem sinais de aerossaculite devido à combinação de *M. synoviae* com outras bactérias ou vírus patogénicos (Lysnyansky, et al., 2013), nomeadamente o paramixovírus aviário (APMV-1) na Doença de Newcastle e o coronavírus na Bronquite Infecciosa (Senties-Cué, et al., 2005; Seifi & Shirzad, 2012), ou mesmo com a vacinação com um destes dois agentes. Uma dupla infeção de *M. synoviae* e o vírus da Doença de Gumboro resulta em lesões mais severas nos sacos aéreos. Contudo, não é considerado sinergismo entre infeções duplas de *M. synoviae* com pneumovirus ou *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) (Kleven, 2003).

Os primeiros sinais observados num bando infetado com *M. synoviae* são a crista pálida, claudicação e atraso de crescimento (Kleven, 2003), assim como o aparecimento de pequenas vesículas nos cantos dos olhos e a tumefação dos seios infraorbitários (Nagwa, et al., 2013). Ao longo da progressão da doença, as penas tornam-se eriçadas, a crista retrai-se, podendo adquirir uma cor vermelha azulada, aparecem edemas nas articulações (primeiro no tarso; Figura 5), as almofadas plantares são afetadas e aparecem granulomas no peito (Kleven, 2003; Nagwa, et al., 2013) e as fezes podem ter uma cor esverdeada, sendo abundante a presença uratos (Kleven, 2003; McMullin, 2004). Além disso, as aves infetadas com *M. synoviae* podem apresentar tosse e descargas nasais purulentas (Jarquin & Hanning, 2012) e ainda apatia, desidratação e

emaciação. Contudo, mesmo as mais severamente afetadas, podem continuar a comer e a beber (Kleven, 2003).

Recentemente foi descrito uma anormalidade no ápice da casca do ovo (*EAA - eggshell apex abnormality*), sendo considerada uma nova apresentação de infecção por *M. synoviae* (Lysnyansky, et al., 2013). Esta alteração na casca caracteriza-se pelo aparecimento de uma superfície áspera e com áreas escuras de 2 cm de diâmetro com bordas claras, sendo esta porção translúcida e fina, e consequentemente mais quebrável (Catania, et al., 2010).

Com menor frequência pode ocorrer uma infecção sistêmica de *M. synoviae*, resultando numa sinovite exsudativa nas bainhas dos tendões, nas articulações e nas bolsas sinoviais (Sentfies-Cué, et al., 2005; Seifi & Shirzad, 2012), podendo não ocorrer qualquer tumefação evidente das articulações (Kleven, 2003).

Os problemas respiratórios e a claudicação resultam numa diminuição da taxa de crescimento e diminuição da produção de ovos, provocando perdas económicas significativas na produção intensiva (Seifi & Shirzad, 2012), que podem, no caso particular da produção de ovos, ser minoradas através da aplicação de bons cuidados de manejo (McMullin, 2004). As lesões nos sacos aéreos (responsáveis por rejeições avultadas no matadouro) podem ser observadas em qualquer idade, sendo mais frequentes durante o inverno (Hagan, et al., 2004; Kleven, 2003).

A infecção natural já foi observada em frangos com uma semana de vida, apesar da doença aguda só se manifestar entre as 4 e as 16 semanas de idade (Kleven, 2003). Uma vez ocorrida a infecção, a ave fica portadora para toda a vida (Nagwa, et al., 2013).

Experimentalmente, a inoculação de *M. synoviae* na almofada plantar de um frango implicou o aparecimento de uma condrodistrofia na pata oposta, muito provavelmente, em virtude do aumento do peso na perna oposta à afetada (Kleven, 2003). Outro estudo demonstrou que pode ocorrer artropatia amiloide em frangos infetados por *M. synoviae* (Feberwee, et al., 2008).

A morbilidade num bando com sinovite clínica varia entre 2 e 75%, sendo mais comum oscilar entre 5 e 15%. O envolvimento respiratório é geralmente assintomático, mas 90 a 100% das aves poderão estar infetadas (Kleven, 2003), sendo a taxa de mortalidade inferior a 10% (McMullin, 2004). Um estudo recente revelou uma taxa de mortalidade em bandos de galinhas infetadas com *M. synoviae* de 2,8% (Aras & Sayin, 2014) e em frangos de 1 a 4% (Nascimento, et al., 2005). Em frangos infetados experimentalmente, a mortalidade pode ir de 0 a 100%, dependendo da via e dose de inoculação (Kleven, 2003).

6. Lesões *post mortem*

6.1. Lesões patológicas macroscópicas

Nas fases iniciais de infecção por *M. synoviae*, os sacos aéreos apresentam um exsudado espumoso que se pode tornar caseoso e amarelo (Figura 6-b) (Butcher & Halabi, 2010), enquanto as membranas sinoviais das bainhas tendinosas, das articulações (Figura 7) e da quilha apresentam um exsudado viscoso, cremoso, cinza (Kleven, 2003) e odor *sui generis*. O fígado apresenta-se aumentado, mosqueado e esverdeado ou preto, os rins hipertrofiados, mosqueado e/ou pálidos (Figura 8-a) (Bains, 1979) e o baço também aumentado (Figura 8-c), podendo exibir uma cor muito heterogénea com algumas zonas mais pálidas (Sentíes-Cué, et al., 2005). Algumas estirpes de *M. synoviae* podem conduzir a amiloidose (McMullin, 2004).

Em fases mais avançadas e complicadas de infecção por *M. synoviae* pode-se verificar peri-hepatite, pericardite (Figura 6-a), peritonite, aerossaculite fibrinosa (Butcher & Halabi, 2010), exsudados caseosos nos tendões, articulações, músculos e sacos aéreos e o líquido sinovial (em particular da articulação do tarso e do ombro) cada vez mais diluída (Kleven, 2003).

Um estudo em necropsia de frangos infetados com *M. synoviae* revelou congestão dos pulmões, atrofia da bolsa de Fabricius e timo e o espessamento da parede do proventrículo (Sentíes-Cué, et al., 2005).

6.2. Lesões patológicas microscópicas

As articulações dos frangos e galinhas, em especial nas patas e nos joelhos, podem apresentar um infiltrado de heterófilos e fibrina dentro do espaço articular e ao longo das bainhas dos tendões. As membranas sinoviais podem tornar-se hiperplásicas com formação de vilosidades e um difuso infiltrado nodular subsinovial de linfócitos e macrófagos. A superfície das cartilagens pode tornar-se muito pálida e pouco densa (Kleven, 2003). Outro estudo descreveu que na histopatologia de frangos infetados com *M. synoviae*, a quilha possuía infiltração de linfócitos e células plasmáticas, acumulação de fibrina e heterófilos, linfócitos e macrófagos, e formação de tecido linfóide e fibrose na superfície da sinóvia. (Sentíes-Cué, et al., 2005)

Além disso, os sacos aéreos dos frangos e galinhas podem apresentar um edema ligeiro, proliferação capilar e acumulação de heterófilos e necrose na superfície ou lesões mais severas como hiperplasia das células epiteliais, uma difusa infiltração de células mononucleares e necrose caseosa. (Kleven, 2003)

Outras lesões reportadas em frangos e galinhas são a hiperplasia do sistema macrófago-monócito associada às bainhas das artérias do baço, atrofia do timo e bolsa de Fabricius, e aparecimento de um infiltrado linfóide no coração, moela e fígado (Kleven, 2003), em que a

cápsula de Glisson pode apresentar fibrina, heterófilos e alguns linfócitos. No cérebro e olhos, pode ocorrer infiltração multifocal de linfócitos e algumas células plasmáticas. Noutros órgãos, como a mucosa dos ossos turbinados, seios infraorbitais, traqueia, siringe, mucosa bronquial, interstício dos rins e parte glandular do proventrículo, podem apresentar infiltração de linfócitos e algumas células plasmáticas e macrófagos com formação de nódulos linfóides. (Senties-Cué, et al., 2005).

7. Diagnóstico

O diagnóstico exato e realista da infeção por *M. synoviae* não se pode basear exclusivamente nos sinais clínicos (Bradbury, s.d.), sendo essencial o contributo dos métodos laboratoriais, como a cultura microbiológica, a serologia ou os testes de biologia molecular (Jarquin & Hanning, 2012). Os dois primeiros são tradicionalmente os mais importantes (Aras & Sayin, 2014). O isolamento de *M. synoviae* a partir de lesões do trato respiratório e/ou locomotor em frangos infetados numa fase aguda é bastante mais fácil comparativamente às fases crónicas da infeção. Em contrapartida, os isolamentos de *M. synoviae* do trato respiratório superior são mais fiáveis em frangos numa fase crónica da doença (Kleven, 2003). Os frangos com um dia de idade representam um problema especial, em virtude de não existirem testes de diagnóstico serológicos ou de biologia molecular validados para esta idade (Bradbury, s.d.).

7.1. Cultura

Mycoplasma spp. é considerado um microrganismo fastidioso para realização de cultura devido ao seu crescimento lento e uma vez que algumas estirpes não são identificáveis (Jarquin & Hanning, 2012). Além disso, a cultura deste agente é dispendiosa e inconclusiva (Seifi & Shirzad, 2012), os meios de cultura são específicos e seletivos e o crescimento de bactérias contaminantes poder comprometer o crescimento de micoplasma *in vitro* (Venezie, s.d.; Jarquin & Hanning, 2012).

A zaragatoa traqueal é considerada a melhor forma de recolher material em animais vivos para a cultura de micoplasma, mas em animais mortos podem ser realizadas zaragatoas da traqueia, pulmões, sacos aéreos, oviduto e articulações. No entanto, também se pode recolher a gema do ovo no último terço de incubação, ou seja a partir do 15º dia de incubação (Venezie, s.d.) e amostras de tecidos adquiridas do trato respiratório, como pulmões, sacos aéreos ou traqueia para a cultura de micoplasma (Jarquin & Hanning, 2012).

Os meios de cultura para micoplasma baseiam-se nos seus requisitos nutricionais, sendo deste modo constituídos por um caldo com 10 a 15% de soro animal, rico em proteína (que poderá ser

uma infusão de carne), colesterol e ácidos gordos. A suplementação com um componente derivado de levedura beneficia bastante a cultura destes microrganismos. A este meio são adicionados antibióticos, como a penicilina, e acetato de tálio para inibir a competição de outros organismos. Para o isolamento de *M. synoviae* é adicionado dinucleótico de nicotinamida e adenina (NAD) (Jarquin & Hanning, 2012; Nagwa, et al., 2013).

A gelose de cultura usada para o crescimento de micoplasma é semi-sólida (6 a 8% de agar) e com um pH ligeiramente alcalino (7,4 a 7,6), devendo ser incubado a 37°C num ambiente húmido (Jarquin & Hanning, 2012). Nesse meio formam-se colónias em forma de “ovo estrelado” após 3 a 10 dias de incubação (Figura 9) (Nagwa, et al., 2013).

Frey desenvolveu o primeiro meio de cultura para o isolamento de *Mycoplasma* spp. (Seahorn & Hofacre, 2011), amplamente usado nos E.U.A. e em outros países (Jarquin & Hanning, 2012), sendo este meio de cultura composto por soro de cavalo (Eximlab, 2008). Morton desenvolveu o agar PPLO, um meio de cultura para micoplasma constituído por uma infusão de carne e coração (SPLabor, 2011). O meio SP4 foi produzido para a replicação de bactérias da classe *Mollicutes*, muito fastidiosos como os espiroplasmas, sendo um meio muito rico que contém soro de cavalo. O meio SP4 II, usado no ensaio deste trabalho, é uma adaptação do meio SP4 que cumpre os requisitos para o crescimento de *M. synoviae*, contendo Beta NAD.

A cultura tem uma grande importância, na medida em que permite a obtenção de isolados, essenciais para futuros estudos epidemiológicos (Jarquin & Hanning, 2012), e também para se testar a sensibilidade a antibióticos (Bradbury, s.d.). No entanto, terá de se ter em conta o intervalo de tempo desde a recolha da amostra até ao processamento e congelamento de amostras de tecidos já que interferem nos resultados da cultura. As culturas puras podem ser caracterizadas fenotipicamente e genotipicamente através de técnicas de serologia e de biologia molecular (Jarquin & Hanning, 2012).

7.2. Testes serológicos

Os testes serológicos têm o objetivo de detetar anticorpos produzidos pelo hospedeiro em resposta à infeção por micoplasma, sendo os mais frequentes o teste de aglutinação em placa de soro (SPA), o teste de inibição da hemoaglutinação (HI) e o teste ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) (Jarquin & Hanning, 2012).

Os testes serológicos são rápidos, fáceis de realizar e altamente sensíveis, embora possam produzir muitos falso positivos (Rodriguez & Abad, 2001; Jarquin & Hanning, 2012). Os resultados de serologia podem ser confirmados por isolamento e identificação de *M. synoviae* do

trato respiratório superior ou por PCR (*Polymerase chain reaction*) (Kleven, 2003), sendo também importante a sua interpretação em função dos sinais clínicos (Butcher & Halabi, 2010).

A serologia apresenta algumas desvantagens como incluir reações não-específicas e reações cruzadas entre espécies ou com antígenos vacinais. Adicionalmente, os anticorpos de micoplasma podem não ser detetáveis antes de 1 a 3 semanas p.i. (Jarquin & Hanning, 2012). No entanto, não se observam em condições experimentais reações cruzadas entre *M. gallisepticum* e *M. synoviae* (Nascimento, et al., 2005). Os resultados discordantes no mesmo ou em diferentes testes serológicos podem ser atribuídos a mudanças na superfície dos antígenos devido a ocorrências de mutações (Nascimento, et al., 2005).

Entre os testes serológicos mais utilizados, o **SPA** caracteriza-se por ser económico, sensível (Nagwa, et al., 2013) e precoce na deteção (Rodriguez & Abad, 2001), em virtude de assinalar a presença de anticorpos IgM, produzidos 5 dias p.i. (Butcher & Halabi, 2010). Deste modo, o SPA não deteta anticorpos da gema do ovo ou anticorpos maternos já que estes são predominantemente IgG (Butcher & Halabi, 2010). O soro usado é fresco e pode ser refrigerado durante uma semana (Butcher & Halabi, 2010) e o antígeno usado está comercialmente disponível (Kleven, 2003), podendo ser realizado na maioria dos laboratórios (Butcher & Halabi, 2010). Deste modo, o teste SPA é usado como um teste de triagem inicial para monitorização e serodiagnóstico de bandos (Nagwa, et al., 2013). Perante um resultado positivo de SPA, este deve ser confirmar com provas mais específicas, como o teste HI (Rodriguez & Abad, 2001) ou o teste ELISA (Butcher & Halabi, 2010).

Em alguns bandos infetados com *M. synoviae* podem ocorrer falso positivos com o teste SPA devido à existência de reações cruzada entre antígenos de *M. synoviae* e *M. gallisepticum* e em bandos nas 2 a 8 semanas após vacinação, com vacinas inativas com óleo emulsificante e/ou vacinas originárias de culturas teciduais (Nagwa, et al., 2013). Além disso, os falso positivos podem derivar do uso de antígenos muito sensíveis ou amostras de soro contaminadas, especialmente com *Staphylococcus aureus*, assim como, o uso de placa de teste de antígeno congelada em vez de refrigerada e utilização de soro congelado ou armazenado sob refrigeração por período prolongado (Butcher & Halabi, 2010; Rodriguez & Abad, 2001). Inversamente, o teste SPA pode ter menos sensibilidade que o teste ELISA (Kleven, 2003), estando estes falso negativos associados a espécies de micoplasma naturais atenuadas, contínuas mudanças de características do antígeno e à qualidade do antígeno usado nos procedimentos do teste (Butcher & Halabi, 2010).

O **HI** é um teste que deteta os anticorpos IgG do hospedeiro, deste modo, micoplasma não é detetado tão precocemente como com o teste SPA (Jarquin & Hanning, 2012). Quando

comparado com outros testes disponíveis, o teste HI é um teste com grande especificidade, com baixa sensibilidade, demorado e dispendioso, mas é considerado o melhor teste para confirmar o diagnóstico de infecção por *M. synoviae* ou *M. gallisepticum* (Butcher & Halabi, 2010). Este teste permite, através da placa de microtitulação, verificar a variação de concentração de anticorpo-antigénio, podendo quantificar a quantidade de anticorpos no soro (Jarquin & Hanning, 2012).

No teste HI é muito importante ter uma boa qualidade do soro, pois caso esteja com uma contaminação bacteriana ou com hemólise pode originar resultados inválidos ou ilegíveis. Além disso, em aves infetadas este teste pode não dar resultados positivos antes das duas ou três semanas p.i. (Seahorn & Hofacre, 2011).

Nos testes SPA e HI poder-se-ão verificar resultados falso negativos devido ao facto da infecção ser recente e ainda não terem sido produzidos anticorpos suficientes para serem detetados (Jarquin & Hanning, 2012).

O teste **ELISA** baseia-se na deteção de anticorpos IgG (Jarquin & Hanning, 2012). Sendo um teste específico e sensível, é menos sensível que o teste SPA e menos específico que o teste HI. Contudo, este teste é muito usado por ser rápido, económico e fácil de realizar (Butcher & Halabi, 2010). O teste ELISA é a técnica mais promissora para substituir os testes SPA e HI (Nascimento, et al., 2005).

O resultado positivo pode ser visualizado por uma alteração de cor na placa de ELISA, sendo a quantidade de anticorpos ou antigénios ligados diretamente proporcional à intensidade de cor desenvolvida. (Jarquin & Hanning, 2012). Se o soro for congelado pode ser usado no teste ELISA, o que não acontece com o teste SPA (Seahorn & Hofacre, 2011).

Os resultados positivos são confirmados, quando possível, com o teste HI. Foram reportados mais falso positivos de *M. synoviae* do que de *M. gallisepticum* (Butcher & Halabi, 2010). Em contrapartida, também se podem obter resultados falso positivos nos teste SPA e HI, muito particularmente quando as aves são vacinadas. A vacinação estimula a produção de anticorpos que poderão circular durante duas a cinco semanas. Os falso positivos podem também ser atribuídos à contaminação do soro, congelação e descongelação do soro e, eventuais, reações cruzadas com outros anticorpos. Estes falso positivos podem ser reduzidos pelo aquecimento do soro a 56°C durante 30 minutos ou pela diluição do soro (Jarquin & Hanning, 2012).

Os kits de ELISA têm sido recentemente usados para monitorização e serodiagnóstico de bandos (Nagwa, et al., 2013), e para verificar a resposta vacinal (Seahorn & Hofacre, 2011).

7.3. Testes de biologia moleculares

As técnicas de biologia molecular são cada vez mais populares em virtude da sua precisão e economia, no entanto, o investimento inicial necessário para a aquisição do equipamento é bastante elevado (Jarquin & Hanning, 2012). Destes destaca-se a técnica de **PCR** que mostra resultados promissores na identificação de infeção por *M. gallisepticum* e *M. synoviae* em frangos comerciais (Butcher & Halabi, 2010), sendo uma alternativa ao isolamento microbiológico. A técnica de PCR deteta ADN de *M. synoviae* de forma rápida (menos de 24 horas), altamente sensível e muito específica (Aras & Sayin, 2014; Jarquin & Hanning, 2012).

A recolha da amostra é bastante simples, sendo efetuada através de uma zaragatoa traqueal ou até mesmo de ovos não eclodidos (Butcher & Halabi, 2010). Também podem ser utilizadas amostras de tecidos, meios de cultura (Kleven, 2003) ou zaragatoas da fenda palatina (Jarquin & Hanning, 2012). O manuseamento das amostras deve ser tratado com muito cuidado, já que o ADN pode ser facilmente degradado (ADNases) e as amostras podem ser facilmente contaminadas, produzindo falso positivos (Bradbury, s.d.; Seahorn & Hofacre, 2011). Os tecidos e as zaragatoas devem ser mantidos a temperaturas baixas ou armazenadas no congelador, não podendo ser expostos à luz direta ou raios UV, nem ser tocados diretamente com as mãos (Seahorn & Hofacre, 2011).

As amostras são transportadas num meio refrigerado e enviadas para o laboratório (Butcher & Halabi, 2010). A técnica de PCR geral para micoplasma pode amplificar produtos de ADN de nove espécies de micoplasma (Nagwa, et al., 2013). Este teste para *M. synoviae* baseia-se no gene 16S rRNA e no gene da hemaglutinina *uhlA* (Aras & Sayin, 2014). O gene *uhlA* é tipicamente utilizado para genotipagem e diferenciação de estirpes. Estes genes referidos anteriormente permitem detetar e sequenciar produtos de PCR, permitindo um rastreamento epidemiológico. Outros autores utilizam a técnica PCR para marcar a região entre os genes rRNA 16S e 23S, permitindo detetar e distinguir *M. synoviae* de outros 22 micoplasmas aviários. Todos estes diferentes conjuntos de *primers* ainda não foram comparados, portanto ainda se desconhece se um conjunto de *primers* é mais preciso e sensível que outro (Jarquin & Hanning, 2012).

Uma das vantagens da técnica de PCR é a possibilidade de comparar a sequência de informação obtida com outra sequência isolada, o que possibilita determinar se a presença de *M. synoviae* ou *M. gallisepticum* da amostra é uma estirpe vacinal ou de campo (Seahorn & Hofacre, 2011). Esta técnica é bastante rápida (resultados em 24 a 36 horas), muito específica e sensível, permitindo ainda que a presença de micoplasma possa ser detetada em amostras que estão contaminadas com bactérias e a infeção possa ser detetada no início, desde que a presença dos organismos seja maior que a resposta imune resultante da infeção (Butcher & Halabi, 2010).

A técnica de PCR em tempo real, que também possibilita a detecção de sequências de ácidos nucleicos específicos, baseia-se num sistema de fluorescência que possibilita monitorizar a amplificação durante a reação. Uma vez que a técnica de PCR em tempo real necessita de menos ciclos de amplificação, os resultados são obtidos mais rapidamente (40 minutos), reduzindo os custos com reagentes e os resíduos perigosos. Os resultados duvidosos podem ser confirmados com curvas de fusão, o que demonstra que é uma técnica mais vantajosa relativamente à técnica de PCR tradicional (Jarquin & Hanning, 2012).

A tipificação molecular da bactéria é uma ferramenta importante para estudos epidemiológicos (Marois, et al., 2000). Permite-nos a determinação da fonte da infeção, a identificação de surtos, que ajuda na monitorização de programas de vacinação e relaciona estirpes de bandos próximos (Aras & Sayin, 2014).

Recentemente foi demonstrado que a técnica de PCR-RFLP é um método que possibilita uma diferenciação entre estirpes vacinais de estirpes de campo recolhidas por zangaratoas traqueais (Nagwa, et al., 2013). Além disso, outro teste designado RAPD determina o genótipo de microrganismos e tem sido usado para a tipificação molecular de isolados de *M. synoviae*, sendo uma valiosa ferramenta para estudos epidemiológicos de vários isolados de *M. synoviae* (Aras & Sayin, 2014).

7.4. Diagnósticos diferenciais

O diagnóstico diferencial de *M. synoviae* inclui *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella spp.* e Reovírus, pela sinovite e tumefação das articulações. Por sua vez, *M. gallisepticum* deve ser diferenciado de Coronavírus, APMV-1, *Haemophilus gallinarum*, Pneumovírus e ORT, pela sintomatologia respiratória (Butcher & Halabi, 2010; Kleven, 2003; McMullin, 2004).

8. Prevenção e controlo

A melhor solução para o controlo de *M. synoviae* é a erradicação. No entanto para a eliminação completa numa exploração é necessário superar diversos obstáculos (North, 1984). A moderna produção aviária está espalhada por diversas áreas do mundo, e a ênfase no controlo de infeção por micoplasma tem sido centrada à volta da manutenção das reprodutoras livres de *M. gallisepticum* e *M. synoviae*, e deste modo mantendo os bandos de produção (frangos e poedeiras) livres desta infeção. Em muitas partes do mundo, este controlo revelou ser um sucesso (Jarquin & Hanning, 2012). Contudo, o rápido crescimento da avicultura no mundo, implicando uma grande concentração de aves em pequenas áreas, leva a um aumento do risco

de exposição ao *M. synoviae* (Kleven, s.d.). Portanto, um programa de controlo constante e um programa estrito de biossegurança são a chave para a prevenção de infeção por *M. synoviae* (Jarquin & Hanning, 2012).

As medidas de biossegurança são práticas de manejo projetadas para diminuir o risco de entrada de agentes patogénicos em aviculturas e reduzir a sua difusão entre aviários. Para o agente micoplasma o objetivo é prevenir a difusão da infeção dentro da cadeia de produção mantendo os pavilhões de reprodutoras livres de micoplasma, deste modo a biossegurança assenta na localização e desenho da avicultura, no respeito do vazio sanitário e na aplicação de boas práticas limpeza e desinfecção dos aviários (Bradbury, s.d.). Outras medidas de biossegurança incluem a produção *all-in all-out*, granjas de “idade única”, aquisição de reprodutoras e poedeiras livres de *M. synoviae* (Butcher & Halabi, 2010), proibição da entrada de aves selvagens ou outros animais, assim como o cuidado na exigência de banhos e uso de roupas especiais às pessoas que entrem nas explorações (Nagwa, et al., 2013).

A transmissão de *M. synoviae* pode ocorrer de forma vertical, e por isso é essencial uma monitorização dos bandos de galinhas reprodutoras positivas a *M. synoviae* (Seifi & Shirzad, 2012). A decisão de abate de bandos *Grand Parent* (GP) infetados é essencialmente condicionada por critérios económicos: se o bando em questão for mantido em produção, a descendência terá de ser eclodida separadamente e isolada de bandos livres de *M. synoviae*. (Kleven, 2003); por sua vez, estas aves têm um grande valor genético. A monitorização destes bandos é essencial, o que acresce o custo em testes de diagnósticos, contudo este investimento é relativamente baixo comparado com o potencial custo imputável à infeção por *M. synoviae* (Jarquin & Hanning, 2012). Nesta avaliação importa também considerar o modelo de exploração aplicado; e.g. quando as explorações albergam bandos com diferentes idades, o abate de um bando positivo pode ter pouco significado no estatuto sanitário da exploração (Butcher & Halabi, 2010).

A produção de frangos ocorre numa escala muito grande, em que cada pavilhão pode ter 15000 a 30000 frangos e onde a transmissão da infeção é rápida devido à proximidade dos frangos. O controlo de *M. synoviae* em frangos é dependente do tempo da infeção e da imunocompetência das aves.

A prevenção de infeção por *M. synoviae* em ovos incubados pode ser feita através do tratamento com tilosina (Nagwa, et al., 2013) ou gentamicina (Kleven, 2003), ou pela incubação dos ovos à temperatura de 46°C, no entanto esta elevada temperatura pode resultar numa redução da eclosão dos ovos (Jarquin & Hanning, 2012). A vacinação para micoplasma na incubadora é uma alternativa mas nem sempre é efetiva (Jarquin & Hanning, 2012).

No entanto, todas as melhorias gerais no controlo de micoplasma têm por vezes resultado num decréscimo nos esforços na biossegurança, aumentando assim as possibilidades de transmissão de infeções por micoplasma. Existe cada vez mais uma tendência para deixar de parte a produção com multi-idades. No entanto, apesar dos esforços e melhoramentos na biossegurança, a falta de conhecimento da sobrevivência de micoplasma fora do hospedeiro tem proporcionado o aparecimento de novos surtos de *M. synoviae* (Kleven, s.d.).

Em suma, não existem tratamentos ou terapias preventivas com 100% de eficácia contra a infeção por *M. synoviae*, portanto a prevenção através de biossegurança e monitorização são as melhores opções (Jarquin & Hanning, 2012).

8.1. Tratamento com antibióticos

O tratamento de *M. synoviae* com antibiótico é usado com o objetivo de diminuir a seroconversão, a infeção (Butcher & Halabi, 2010), o número de micoplasmas que são excretados pela ave e o nível de transmissão através dos ovos (Kleven, 2003; Bradbury, s.d.), reduzindo deste modo as perdas económicas causadas pelos sinais clínicos de *M. synoviae* (Lysnyansky, et al., 2013). No entanto, o uso de antibióticos não eliminará por completo a infeção e as perdas por *M. synoviae*, apresentando como desvantagens o custo e a possibilidade de desenvolvimento a resistências (Butcher & Halabi, 2010).

O agente micoplasma é sensível às tetraciclina (oxitetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina), aos macrólidos (eritromicina, tilosina, espiramicina, kitasamicina), à lincomicina, às quinolonas (norfloxacina, enrofloxacina, danofloxacina) e à tiamulina (Nagwa, et al., 2013). Dos referidos antibióticos, apenas o uso da oxitetraciclina, doxiciclina, tilosina, lincomicina, enrofloxacina e tiamulina são autorizados em frangos e/ou galinhas em Portugal (DGAV, 2014).

Em surtos graves a oxitetraciclina ou a eritromicina podem ser administradas em aves adultas individualmente (North, 1984). Estudos revelaram que a clortetraciclina providência um controlo contínuo satisfatório da sinovite em frangos e que em concentrações mais elevadas controla a sinovite p.i., contudo a eficácia pode estar relacionada com os isolados de *M. synoviae* envolvidos (Kleven, 2003).

Outros estudos referem que a interação de lincomicina com espectinomicina pode ser benéfica, prevenindo aerossaculite em frangos (Kleven, 2003).

O tratamento com tilosina, nas galinhas reprodutoras e poedeiras, melhora a qualidade da casca do ovo, reduz as perdas por rejeição e aumenta o peso do ovo (Catania, et al., 2010). O uso deste antibiótico em frangos e galinhas é efetivo no início da doença, particularmente no controlo

de sintomas respiratórios (Bains, 1979) e o mais usado atualmente no combate à infecção por *M. synoviae*.

Em 1989, um estudo revelou eficácia da enrofloxacina no controlo da infecção por *M. synoviae*, diminuindo a mortalidade em frangos e galinhas (Jordan, et al., 1989). Atualmente, este antibiótico é usado largamente em muitos países para o tratamento de variadas doenças de galinhas e frangos, muitas dessas doenças associadas a *E. coli*, *Pasteurella multocida* e micoplasmose. No entanto tem-se vindo a revelar não ser efetiva contra *M. synoviae* (Stanley, et al., 2001) e a demonstrar preocupações na saúde humana, o que contribuiu para a sua proibição em alguns países, como é o caso dos EUA, onde foi banida em 2005 (Lysnyansky, et al., 2013; Stanley, et al., 2001).

A tiamulina tem mostrado eficácia na prevenção de aerossaculite e sinovite em frangos (Kleven, 2003).

O tratamento com antibióticos de largo espectro é efetivo no controlo de infeções secundárias (Bains, 1979). Esta prática tem provocado alguma contenção devido ao desenvolvimento de bactérias resistentes. Deste modo, pode ser aplicada a terapia metafilática, que se baseia no uso de antibióticos seletivos contra micoplasma, o que reduz o desenvolvimento de resistências em outras bactérias, deixando os antibióticos de largo espectro eficazes para uso, caso sejam necessários no futuro. Este tratamento de marcação e planeamento tem vindo a ser um sucesso em frangos e reprodutoras, em que o seu objetivo é limitar a transmissão horizontal, reduzindo o número de organismos de micoplasma que as aves transportam e a severidade da doença em aves infetadas (Butcher & Halabi, 2010).

Terá de se ter em conta que, uma vez que um bando é tratado com antibióticos para a infecção por *M. synoviae*, a informação disponível para testes de diagnóstico é limitada a longo prazo (Stanley, et al., 2001).

8.2. Vacinação

A vacinação contra *M. synoviae* pode ser útil como solução a longo prazo, em situações onde a manutenção de aves livres de infecção não é possível, especialmente em explorações com aves de diferentes idades (Nagwa, et al., 2013).

Está disponível comercialmente uma vacina viva da estirpe MS-H, que persiste durante toda a vida do bando, estimula respostas imunes humorais e celulares, reduz as perdas na produção de ovos, permite um decréscimo do uso de medicamentos, previne a infecção num bando e previne a transmissão horizontal e vertical. Em contrapartida esta vacina apresenta a necessidade de ser administrada antes da infecção de campo e de não poder ser usada com uso

de antibióticos com reatividade sobre micoplasma (Butcher & Halabi, 2010). Nos casos em que é necessário o uso de antibióticos, estes não podem ser administrados no momento da vacinação, nem num prazo de 2 semanas após a vacinação (Merial, s.d.). Além disso, tem uma eficácia limitada contra variantes de estirpes de campo e o seu custo é elevado. Esta vacina é usada com sucesso em reprodutoras em algumas regiões onde estão presentes estirpes de *M. synoviae* mais virulentas, mas raramente são usadas em poedeiras (Butcher & Halabi, 2010), devendo o seu uso ser considerado em bandos de multi-idades onde a infeção seja “inevitável” (OIE, 2013). Em 2010, um estudo revelou que o número de ovos com o ápice da casca deformada (EAA) podia ser reduzido pela administração desta vacina viva contra *M. synoviae* (Catania, et al., 2010). Existe uma vacina bacteriana MS-BAC contra *M. synoviae* que foi licenciada nos E.U.A., mas ainda não é muito usada (OIE, 2013).

Material e Métodos

Reprodutoras

Neste estudo foram usados dados e informações recolhidos em galinhas reprodutoras (Tabela 1), gentilmente fornecidos pelo Dr. Fernando Moreira.

As galinhas reprodutoras testadas pertenciam a treze bandos de estipes *Cobb 500* e *Ross 308* e a um bando de estirpe *Redbro Cou Nu*. O programa vacinal destes bandos incluiu a Doença de Marek, Bronquite infecciosa (Ma5 e 4/19), Doença do Gumboro, Doença de Newcastle, Salmonela, Reovirus, Metapneumovírus aviário, Coccidiose, Anemia infecciosa aviária, Laringotraqueíte infecciosa, Varíola aviária e Encefalomielite aviária.

Todos os bandos de galinhas reprodutoras foram testadas para *M. synoviae*, através do método de ELISA (BioChek, Itália), pelo menos duas vezes após as 30 semanas de idade, para evitar falso positivos, entre as 30 e 40 semanas e entre as 50 e 60 semanas de idade. Nos resultados positivos, foi realizado o teste PCR (com amostras de traqueias) para confirmação.

Tabela 1 Resultados de testes ELISA e PCR para *M. synoviae* em galinhas reprodutoras (n=14).

Nº do bando	Estirpe	Idade da recolha de amostra (semanas)	Método de diagnóstico para <i>M. synoviae</i>	Resultado (<i>M. synoviae</i>)
1	<i>Cobb 500</i>	30	Elisa	neg.
2	<i>Cobb 500</i>	27	Elisa	neg.
		33	Elisa	neg.
		34	Elisa	neg.
3	<i>Cobb 500</i>	35	Elisa	neg.
		38	Elisa	neg.
		40	Elisa	neg.
4	<i>Ross 308</i>	50	Elisa + PCR	pos.
		55	Elisa + PCR	pos.
5	<i>Ross 308</i>	33	Elisa + PCR	pos.
6	<i>Cobb 500</i>	45	Elisa	neg.
		50	Elisa	neg.
7	<i>Ross 308</i>	30	Elisa + PCR	pos.
		25	Elisa + PCR	pos.
8	<i>Ross 308</i>	46	Elisa + PCR	pos.
9	<i>Ross 308</i>	38	Elisa + PCR	pos.
		32	Elisa + PCR	pos.
10	<i>Ross 308</i>	46	Elisa + PCR	pos.

		56	Elisa + PCR	pos.
11	Cobb 500	35	Elisa + PCR	pos.
		36	Elisa + PCR	pos.
12	Ross 308	48	Elisa	neg.
13	Ross 308	64	Elisa + PCR	pos.
14	Redbro Cou Nu	28	Elisa	neg.
		29	Elisa	neg.

Pos.- positivo; neg.- negativo.

As galinhas positivas podem apresentar uma variedade de sinais clínicos ou podem ser assintomáticas. Os sinais clínicos observados vão desde problemas respiratórios, sinovite e a relatos de casos de má formação da casca do ovo. No entanto, nunca foi isolado de ovário de reprodutoras.

Frangos

O ensaio foi realizado em 26 quintas com frangos da empresa Lusiaves durante o período de dezembro de 2013 a fevereiro de 2014. Das 26 quintas, 17 explorações integradas, seis granjas de produção própria e 3 explorações integradas de frango do campo, localizadas em diferentes regiões de Portugal.

Os bandos de frangos testados pertenciam à estirpe *Cobb 500* e *Ross 380* e os frangos do campo à estirpe *Redbro Cou Nu*. O programa vacinal dos bandos de frango incluiu: Doença de Newcastle, Doença de Gumboro e Bronquite Infeciosa (Ma5 e 4/19) e dos bandos de frangos do campo: Bronquite Infeciosa (Ma5 e 4/19), Doença de Marek, Coccidiose, Doença de Newcastle e Doença de Gumboro.

O ensaio foi dividido em três grupos de bandos de frangos (Tabela 2), de acordo com os tipos de testes de diagnóstico realizados para *M. synoviae*.

Tabela 2 Grupos de bandos de frangos e testes de diagnósticos realizados no ensaio.

Grupos	Nº de bandos testados	Testes de diagnóstico realizados
A	11	Cultura meio SP4 II + ELISA
B	9	ELISA
C	14	PCR

A escolha dos bandos dos grupos A e C baseou-se em sinais clínicos de problemas respiratórios e locomotores, enquanto os bandos do grupo B foram escolhidos aleatoriamente. A recolha das amostras variou consoante o tipo de teste a realizar (Tabela 3).

Tabela 3 Amostras e locais de recolha para os testes de diagnóstico para *M. synoviae*.

Testes de diagnóstico para <i>M. synoviae</i>	Amostra/bando	Local de recolha
Cultura meio SP4 II	15 zaragatoas traqueais por 3 tubos	Em campo, animais vivos e carcaças (recentes)
ELISA	12 soros	Na sangria em matadouro
PCR	14 zaragatoas traqueais por 4 tubos	Em campo, carcaças (recentes)
	Zaragatoas sinoviais (amostra de um frango/tubo)	Em campo, carcaças (recentes)

A recolha de sangue foi realizada em matadouro no momento da sangria. Posteriormente as amostras sob refrigeração foram enviadas para o laboratório CONTROLVET®, com exceção das amostras do bando 6 que seguiram para o INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária I.P., ambas em Portugal.

Relativamente às zaragatoas traqueais, estas realizaram-se do seguinte modo: visualização da glote e introdução de uma zaragatoa, rodando para arrastar o conteúdo traqueal. No caso de frangos muito novos, sensivelmente menos de 10 dias, a recolha era feita em cadáveres frescos, em virtude da traqueia ter um diâmetro inferior ou igual ao da zaragatoa.

As zaragatoas traqueais realizadas nas aves do grupo A foram colocadas em tubos com o meio SP4 II à temperatura ambiente e enviadas para o Laboratório Dr. Esteve S.A. em Barcelona – Espanha e para a Universidade de Las Palmas de *Gran Canaria* – Espanha. O intervalo desde a recolha até o envio não ultrapassou as 48 horas. Adicionalmente, foram recolhidas amostras de sangue dos mesmos bandos de frango para testes ELISA.

No grupo B foram recolhidas amostras de sangue para o teste ELISA. Enquanto que para o grupo C foram realizadas zaragatoas traqueais que posteriormente foram colocadas em tubos de ensaio com tampa e armazenadas no frio até ao envio para o laboratório LABOCOR S.L. em Madrid – Espanha.

Adicionalmente nestes bandos foram investigados e registados sinais clínicos, lesões de necropsia, tratamentos realizados (Tabela III) e dados do abate (número de animais abatidos, idade ao abate, peso médio (PM), taxa de mortalidade acumulada (TMA), dermatite das almofadas plantares (DAP), inspeção *ante-mortem*, rejeitados por patologias, inspeção *post-*

mortem) (Tabela IV) através de informações recolhidas ou fornecidas pelos Médicos Veterinários e técnicos responsáveis pelas explorações.

Cultura em meio SP4 II

A cultura microbiológica foi realizada em meio SP4 II, disponibilizado pelo laboratório ESTEVE, Portugal. O meio SP4 foi desenvolvido para o crescimento de bactérias da classe *Mollicutes*. O meio SP4 II é uma adaptação para o crescimento específico de *M. synoviae*, deste modo contém Beta NAD. A sua composição inclui soro de cavalo.

ELISA

Foram usados *kits* de ELISA (BioChek, Itália), específicos para diagnósticos na área de medicina veterinária, pelo laboratório CONTROLVET® e INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária I.P., ambos em Portugal.

PCR

O teste de PCR usado baseou-se na qualidade das sequências de ADN específicas de cada micoplasma do gene 16S rRNA e foi realizado no Laboratório Dr. Esteve S.A. e no laboratório da Universidade de las Palmas de *Gran Canaria*, ambos em Espanha.

Resultados

Os resultados obtidos dos testes de diagnóstico para *M. synoviae* foram todos negativos (Tabelas 4, 5 e 6), com exceção do bando 6 no teste ELISA. A comparação dos resultados de testes de diagnóstico para *M. synoviae* entre os frangos e as reprodutoras são apresentados na Tabela 7.

Tabela 4 Resultados da cultura e teste ELISA para *M. synoviae* do grupo de bandos de frangos A (n=11).

Bandos de frangos	Cultura SP4 II	Idade recolha-cultura (dias)	ELISA	Idade recolha-sangue (dias)	Problemas Respiratórios	Problemas Locomotores
1	neg.	46	neg.	46	não	não
2	neg.	18	s.i.	s.i.	não	sim
3	neg.	28	neg.	38	sim	não

4	neg.	18	neg.	32	não	não
5	neg.	33	neg.	41	sim	não
6	neg.	18	pos.	5	sim	Sim
7	neg.*	19	neg.	36	sim	não
8	neg.	21	s.i.	s.i.	sim	não
9	neg.	24	neg.	35	sim	não
10	neg.	14	neg. (2)	36	sim (2)	sim (1)
11	neg.	38	neg.	33 (1) e (2)	sim	sim

Pos.- positivo; neg.- negativo; s.i.- sem informação; (1)- pavilhão 1; (2)- pavilhão 2; *- entrega tardia da amostra, amostra possivelmente danificada.

Tabela 5 Resultados do teste ELISA para *M. synoviae* do grupo de bandos frangos B (n=9).

Bandos de frangos	ELISA	Idade recolha do sangue (dias)
12	neg.	37
13	neg.	32
14	neg.	38
15	neg.	34
16	neg.	31
17	neg.	30
18	neg.	34
19	neg.	36
20	neg.	33

Neg.- negativo.

Tabela 6 Resultados do teste PCR para *M. synoviae* do grupo de bandos C (n=14).

Bandos de frangos	PCR	Idade da recolha (dias)	Problemas respiratórios	Problemas locomotores
21	neg.	27	não	não
22	neg.	35	sim	não
23	neg.	39	não	não
24	neg.	29	não	não
25	neg.	34	sim	não
26	neg.	27	s.i.	s.i.
27	neg.	27	s.i.	s.i.
28	neg.	27	sim	sim

29	neg.	28	sim	sim
30	neg.	28	s.i.	s.i.
31	neg.	38	sim	sim
32	neg.	35	não	sim
33	neg.	31	não	sim
34	neg.	25	não	sim

Pos.- positivo; neg.- negativo; s.i.- sem informação.

Tabela 7 Comparação dos resultados dos frangos e das reprodutoras (n=34).

Bandos de frangos	Problemas Respiratórios	Problemas Locomotores	Cultura PS4 II - frangos	ELISA - frangos	PCR - frangos	Bandos de Reprodutoras	Diagnóstico <i>M. synoviae</i> - reprodutoras
1	não	não	neg.	neg.		1	neg.
2	não	Sim	neg.			1	neg.
3	sim	não	neg.	neg.		2	neg.
4	não	não	neg.	neg.		3	neg.
5	sim	não	neg.	neg.		4	pos.
6	sim	Sim	neg.	pos.		5	pos.
7	sim	não	neg.*	neg.		6	neg.
8	sim	não	neg.			3	neg.
9	sim	não	neg.	neg.		6	neg.
10	sim (2)	sim (1)	neg.	neg. (2)		6	neg.
11	sim	sim	neg.	neg.		7	pos.
12				neg.		7	pos.
13				neg.		2	neg.
14				neg.		2	neg.
15				neg.		8	pos.
16				neg.		4	pos.
17				neg.		3	neg.
18				neg.		7	pos.
19				neg.		9	pos.
20				neg.		10	pos.
21	não	não			neg.	11	pos.
22	sim	não			neg.	8	pos.
23	não	não			neg.	12	neg.
24	não	não			neg.	9	pos.
25	sim	não			neg.	13	pos.
26	s.i.	s.i.			neg.	10	pos.
27	s.i.	s.i.			neg.	10	pos.
28	sim	sim			neg.	10	pos.
29	sim	sim			neg.	11	pos.

30	s.i.	s.i.			neg.	11	pos.
31	sim	sim			neg.	2	neg.
32	não	sim			neg.	14	neg.
33	não	sim			neg.	14	neg.
34	não	sim			neg.	14	neg.

Pos.- positivo; neg.- negativo; s.i.- sem informação; (1)- pavilhão 1; (2)- pavilhão 2; *- entrega tardia da amostra, amostra possivelmente danificada.

A maioria dos bandos de frangos dos grupos A e C apresentavam sinais clínicos (essencialmente espirros, tosse e claudicações) que nos fizeram suspeitar de infecção por *M. synoviae*. Porém, não se verificou qualquer relação evidente entre a existência de sinais clínicos compatíveis, a infecção das progenitoras e os resultados obtidos pelos testes realizados aos frangos para a detecção de *M. synoviae*.

Discussão e Conclusão

As doenças respiratórias em aves são responsáveis pelas maiores perdas económicas na avicultura. A diversidade de agentes patogénicos, conjuntamente com a interdependência destas infeções com fatores de manejo animal torna muitas vezes difícil o diagnóstico do agente primário (Minharro, et al., 2001). Entre os agentes microbianos associados a patologia respiratória, *M. synoviae* emerge como importante agente primário e, simultaneamente, potenciador da infeção por invasores secundários (e.g. *E. coli*). Adicionalmente, o agente *M. synoviae* aparece associado à diminuição da produção de ovos e taxa de eclosão, a elevadas taxas de rejeição de carcaças por aerossaculites e artrites (Marois, et al., 2000), a um alto índice de conversão (Nagwa, et al., 2013), a perdas de ovos pelas anormalidades no ápice da casca (EAA) (Feberwee, et al., 2008), à diminuição do crescimento dos frangos e aos encargos para monitorização e métodos de diagnóstico (Jarquin & Hanning, 2012).

Com o presente trabalho pretendeu-se avaliar a presença de *M. synoviae* em frangos e, simultaneamente, fazer um estudo comparativo das diferentes técnicas usadas para a sua deteção. Os resultados obtidos pelos diferentes testes em 34 bandos de frangos foram todos negativos (Tabela 7), à exceção do teste ELISA relativo ao bando 6, sendo este resultado possivelmente um falso positivo: atendendo a que o teste ELISA deteta anticorpos IgG a partir dos 7 - 10 dias p.i. (Luciano, et al., 2011), tendo os frangos apenas 5 dias de idade, não teria havido tempo para uma produção de anticorpos por infeção por *M. synoviae*. Os anticorpos encontrados neste bando deveriam ser anticorpos maternos já que o bando das suas

progenitoras (bando 5) revelou ser positivo para *M. synoviae*. Além disso, o resultado da cultura para *M. synoviae* no bando de frangos 6 foi negativo.

Apesar de 17 dos 34 bandos estudados provirem de reprodutoras positivas (Tabela 7), apenas o bando 6 evidenciou um resultado “positivo”. Sendo amplamente reconhecida a importância da **transmissão vertical** de *M. synoviae*, este facto pode ser justificado pelo facto dos outros bandos analisados serem mais velhos e, também, pelo facto de muitos bandos nascidos de mães infectadas permanecem livres da infeção (Kleven, 2003).

Na avaliação dos resultados é, também, preciso considerar a possibilidade da existência de falso negativos ou a eventualidade mais remota de, dentro de um bando infectado com *M. synoviae*, as amostras terem sido recolhidas em frangos não infectados. De acordo com Buim, et al., 2009 a **transmissão horizontal** não ocorre em 100% dos casos, sendo reconhecido que o número de amostras recolhidas influencia a prevalência de *M. synoviae* (Feberwee, et al., 2008). Em suma, num bando podem estar frangos infectados com *M. synoviae*, o que não significa que todos os frangos do bando estejam infectados. No entanto, seria muita coincidência nos 34 bandos e em todas as recolhas, apenas terem sido recolhidas amostras de frangos não infectados.

Outros fatores mais prováveis podem ter influenciado os resultados deste estudo, nomeadamente os tratamentos com antibióticos, a idade dos frangos, a existência de estirpes de *M. synoviae* atenuadas ou menos invasivas, as características de cada teste de diagnóstico e qualidade das amostras recolhidas.

A deteção e o isolamento podem ser fortemente comprometidos pela administração de determinados **antibióticos**, em virtude destes poderem bloquear ou reduzir a resposta imune e forçar o agente micoplasma a invadir os tecidos, tornando-os indisponíveis para deteção por cultura e PCR (Nascimento, et al., 2005). Um estudo revelou uma prevalência de *M. synoviae* inesperadamente baixa em bandos de frangos submetidos a tratamento antimicrobiano (Feberwee, et al., 2008). Tal acontecimento pode também ter ocorrido nos bandos deste estudo, uma vez que muitos foram medicados com antimicrobianos aos quais o agente *M. synoviae* é sensível, como é o caso da tilosina, a enrofloxacina, a doxicilina e a lincomicina. Contudo, houve bandos de frangos que não foram medicados com os compostos mencionados, como é o caso dos bandos 1, 7, 8, 9, 10, 14, 16 e 23. O bando 16 era o único que pertencia a um bando de progenitoras (bando 4) positivas a *M. synoviae*, e em que se podia verificar uma transmissão vertical, através de diagnósticos laboratoriais sem a interferência de antibióticos administrados. No entanto, esse bando revelou-se negativo a *M. synoviae* e para além disso não foi possível verificar a existência de sinais clínicos, nem alterações significativas em matadouro compatíveis com a doença. Dos restantes bandos de frangos referidos, e pensando numa possível

transmissão vertical, o resultado foi o esperado, já que as progenitoras dos frangos pertencentes aos bandos 1, 2, 3, 6 e 12, eram negativas a *M. synoviae*.

Os frangos em estudo tinham idades compreendidas entre os 28 a 46 dias (Tabela III), sendo admissível que este facto tenha influenciado os resultados obtidos (Feberwee, et al., 2008). Alguns trabalhos já publicados têm vindo a fortalecer a ideia segundo a qual a **idade** dos frangos pode influenciar a prevalência de *M. synoviae*, sendo mais frequente o seu isolamento entre as 27 e as 28 semanas de idade (Fiorentin, et al., 2003) e sendo ainda mais elevada em reprodutoras com 60 semanas de idade (Seifi & Shirzad, 2012). Um estudo envolvendo a pesquisa de *M. synoviae* através dos testes de ELISA e HI verificou que bandos de galinhas entre as 7 e 23 semanas de idade eram negativas, enquanto os bandos mais velhos com idades superiores a 28 semanas foram positivos (Luciano, et al., 2011).

No entanto, as **características de cada teste de diagnóstico** também podem ter contribuído para a baixa deteção de *M. synoviae*, pois a especificidade e sensibilidade dos testes têm inevitáveis impactos sobre a prevalência de *M. synoviae* apurada (Feberwee, et al., 2008). Uma serologia negativa pode resultar de uma infeção recente (Xavier, et al., 2011), infeções não virulentas ou atípicas de baixo potencial imunológico (Luciano, et al., 2011), sendo reconhecido que os títulos de anticorpos também variam de acordo com o isolado e via de infeção (Lockaby, et al., 1998). Deste modo, foram realizados outros testes de diagnóstico, para contornar as limitações da serologia, como a cultura de *M. synoviae* e PCR. O teste PCR deteta o agente patológico antes da resposta imunológica do hospedeiro ou em hospedeiros com depressão da imunidade (Buim, et al., 2009), o que foi vantajoso nos frangos testados, já que o agente *M. synoviae* tem um longo período de incubação (11 a 21 dias p.i.) (McMullin, 2004), o que implica uma resposta imunológica tardia para deteção por ELISA. O facto de alguns bandos incluídos neste estudo terem evidências de imunodepressão (problemas digestivos) pode contribuir para um maior atraso e uma maior debilidade na resposta imunitária.

Outra causa que pode justificar a falha de deteção de *M. synoviae* no nosso estudo é a existência de **estirpes de *M. synoviae* atenuadas, estirpes menos invasivas ou mutações de *M. synoviae***, que podem repercutir-se em resultados falso negativos nos testes de diagnóstico, afetando a sua sensibilidade (Butcher & Halabi, 2010; Xavier, et al., 2011). Uma vez que micoplasma é mais suscetível a mutações que outras bactérias, as frequentes mudanças na superfície dos antigénios podem permitir ao micoplasma invadir o sistema imune do hospedeiro e facilitar a sua sobrevivência e, assim, justificar os resultados discordantes no mesmo ou em diferentes testes serológicos (Nascimento, et al., 2005). Não se pode assim descartar a possibilidade dos bandos deste estudo estarem infetados com uma estirpe que não induzia

produção de anticorpos, como é o caso de uma recentemente descoberta de estirpe de *M. synoviae* em perus (Kleven, s.d.). Alguns estudos demonstraram que bandos com baixa resposta serológica, com baixa percentagem de reação por PCR, e com resultados de cultura negativos, poderiam estar associados ao facto do antigénio da estirpe estar “escondido”. Deste modo, têm sido sugeridas estirpes atípicas que são indetetáveis com métodos de diagnósticos tradicionais (Kleven, s.d.). Estudos revelaram que clones de *M. synoviae* com hemaglutinina negativa são menos virulentos que os clones com hemaglutinina positiva. O significado de tal variabilidade na expressão da superfície de antigénios continua a não ser totalmente compreendida, contudo parece lógico que irá influenciar a patogénese, a resposta serológica e a invasão no sistema imune dos hospedeiros. Deste modo, potenciais evoluções na especificidade dos testes ELISA poderão influenciar a qualidade do antigénio e resultar, deste modo, na utilização de antigénios de alta purificação ou no uso de bloqueios de ELISA que utilizam um anticorpo monoclonal específico, que por sua vez originam falso negativos para *M. synoviae* nos testes serológicos (Kleven, s.d.; Butcher & Halabi, 2010).

A ocorrência estimada de bandos de frangos positivos a *M. synoviae* depende do número de bandos estudados, do número de **amostras** de frangos por bando e da frequência da recolha de amostras (Feberwee, et al., 2008). Além disso, uma inadequada recolha de amostra de ADN de um bando infetado pode resultar num teste PCR negativo, como foi descrito num estudo na comparação de duas técnicas de PCR. Numa técnica desse estudo foram colocadas 5 a 6 zaragatoas traqueias no mesmo tubo de cultura, o que resultou num PCR positivo e noutra técnica foram colocadas 200 ul de amostra de 5 culturas individuais antes da incubação do meio e usadas como uma amostra, produzindo um PCR negativo. Estes resultados indicam que a primeira técnica usada é mais sensível a obter quantidades suficientes de ADN para a amplificação por PCR (Stanley, et al., 2001), técnica esta que foi usada neste estudo.

Também, um possível manuseamento incorreto das amostra para a análise por PCR pode ter levado à degradação do ADN, uma vez que as amostras expostas por períodos longos à temperaturas ambiente, após a recolha, pode ter degradado a amostra e assim ter influenciado os resultados, em virtude das amostras deverem ser mantidos a 4°C, ou a -70°C quando os períodos de armazenamento forem mais longos (Seahorn & Hofacre, 2011; Bradbury, s.d.; Machado, et al., 2012). Idealmente as amostras para o teste PCR deverão ser enviadas para o laboratório em cinco dias após a recolha (Butcher & Halabi, 2010). Neste estudo, a recolha de uma amostra e o respetivo envio para o laboratório demorou entre um a 12 dias. Uma amostra demorou 19 dias para chegar ao laboratório e ser analisada, tendo sido por esse motivo excluída.

As recolhas de sangue em matadouro não foram presenciadas por intervenientes do estudo, pelo que poderão ter ocorrido erros com potenciais impactos nos resultados.

Além disso, pode ter havido **contaminação** da amostra por outras bactérias, fungos e leveduras, e assim justificar possíveis falso negativos nas culturas de *M. synoviae*, em virtude do crescimento de uma flora contaminante reduzir a probabilidade de isolar *M. synoviae*, comparativamente mais lento a multiplicar-se. Uma forma de minimizar as contaminações das amostras teria sido possível mediante o aumento ou a modificação da concentração dos inibidores de bactérias contaminantes em meios para o isolamento de *M. synoviae* (Marois, et al., 2000; Venezie, s.d.; Fiorentin, et al., 2003).

Em conclusão, descartando a possibilidade de possíveis falso negativos, os resultados deste estudo demonstraram que os bandos estão livres de *M. synoviae*, o que sugere um controlo e biossegurança eficaz contra *M. synoviae*. Contudo, futuros estudos que se possam vir a realizar com igual objetivo devem fazer uma abordagem mais criteriosa de todos os fatores que possam criar falso negativos, de maneira a credibilizar os resultados. Também é importante a pesquisa de diferentes estirpes de *M. synoviae*, assim como o uso de marcadores para detetar a eventual presença intracelular deste agente, e identificar novos agente patogénicos que possam causar os mesmos ou idênticos sinais clínicos de *M. synoviae*, como é o caso do ORT, uma bactéria que está distribuída mundialmente na avicultura industrial, e associada a doença respiratória com aerossaculite e osteíte, meningite e infeções articulares (Empel & Hafez , 1999).

Bibliografia

Abolnik, C. & Gouws, J., 2014. Environment, well-being, and behavior - Reserch Notes - Extended survival times of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* on kanekalon synthetic hair fibres. *Poultry Science*, Volume 93, pp. 8-11.

Aras, Z. & Sayin, Z., 2014. Molecular Epidemiology of *Mycoplasma synoviae* Infection in Commercial Layers. pp. 93-97.

Bains, B. S., 1979. *A Manual of Poultry Diseases*. Switzerland: Roche.

Bolha, L. et al., 2013. Effect of *Mycoplasma synoviae* and lentogenic Newcastle disease virus coinfection on cytokine gene expression in chicken embryos. *Poultry Science*, pp. 3134-3143.

Bradbury, J., s.d. *Micoplasmas Aviaries: Situacion Epidemiologica Actual, Bioseguridad y Diagnostico*. *University of Liverpool*.

Buim, M. R. et al., 2009. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesq. Vet. Bras.*, Volume 29, pp. 552-556.

Butcher, G. D. & Halabi, W. S., 2010. Effectiveness of Antibiotics and Vaccines in Controlling Mycoplasmosis in Breeders. *Elanco Animal Health*.

Butcher, G. D., Jacob, J. P. & Mather, F. B., 2009. Common Poultry Diseases. *University of Florida - IFAS Extension*, pp. 6-7.

Catania, S. et al., 2010. Treatment of Eggshell Abnormalities and Reduced Egg Production Caused by *Mycoplasma synoviae* Infection. *Avian Diseases*, Volume 54, pp. 961-964.

Cobb, S. P., 2011. The spread of pathogens through trade in poultry hatching eggs: overview and recent developments. *Rev. sci. Off. int. Epiz.*, Volume 30, pp. 165-175.

Corporation, V., s.d. *Avian Mycoplasmosis*. [Online]
Available at: <http://vetsoft.com.eg/Article/ArticleData.aspx?ID=91>
[Acedido em 26 abril 2014].

DGAV, 2014. *Lista dos Medicamentos Veterinários Autorizados*. [Online]
Available at: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=17171&cboui=17171>
[Acedido em 24 abril 2014].

Empel, P. C. M. v. & Hafez, H. M., 1999. *Ornithobacterium rhinotracheale*: A review. *Avian Pathology*, Volume 28, pp. 217-227.

Eximlab, 2008. *CALDO MYCOPLASMA DE FREY BASE*. [Online]
Available at: <http://eximlab.com.br/produto.php?codigo=M1050-500G>
[Acedido em 18 fevereiro 2014].

Feberwee, A., Vries, T. S. d. & Landaman, W. J. M., 2008. Seroprevalence of *Mycoplasma synoviae* in Dutch commercial poultry farms. *Avian Pathology*, pp. 629-633.

Fiorentin, L. et al., 2003. Apparent eradication of *Mycoplasma synoviae* in broiler breeders subjected to intensive antibiotic treatment directed to control *Escherichia coli*. *Avian Pathology*, Volume 32, pp. 213-216.

Hagan, J. C., Ashton, N. J., Bradbury, J. M. & Morgan, K. L., 2004. Evaluation of an egg yolk enzyme-linked immunosorbent assay antibody test and its use to assess the prevalence of *Mycoplasma synoviae* in UK laying hens. *Avian Pathology*, pp. 93-97.

Intervet, 1972. Sinovite Infecciosa. Em: *Doenças mais Importantes das Aves*. s.l.:s.n., pp. 57-58.

Jarquín, R. & Hanning, I., 2012. Comparison of Detection Methods for Mycoplasmas of Significance to the Poultry Industry. Em: *Serological Diagnosis of Certain Human, Animal and Plant Diseases*. s.l.:In Tech, pp. 19-26.

Jordan, F. T. W., Gilbert, S., Knight, D. L. & Yavari, C. A., 1989. Effects of Baytril, Tylosin and lamulin on avian mycoplasmas. *Avian Pathology*, Volume 18, pp. 659-673.

Kleven, S. H., 2003. Mycoplasmosis. Em: *Diseases of Poultry*. 11th ed. s.l.:Iowa State Press, pp. 719-774.

Kleven, S. H., s.d. *Current Situation with Avian Mycoplasmosis Prevention and Control*, Georgia: s.n.

Lockaby, S. B., Hoerr, F. J., Lauerman, L. H. & Kleven, S. H., 1998. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in Broiler Chickens. *Vet Pathol*, Volume 35, pp. 178-190.

Luciano, R. L. et al., 2011. Comparative Study of Serological Tests for *Mycoplasma synoviae* Diagnosis in Commercial Poultry Breeders. *Veterinary Medicine International*, pp. 1-5.

Lysnyansky, I. et al., 2013. Molecular Characterization of Acquired Enrofloxacin Resistance in *Mycoplasma synoviae* Field Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 3072-3077.

Machado, L. S. et al., 2012. *Mycoplasma gallisepticum* como fator de risco no peso de lotes de frangos de corte com condenação por aerossaculite na Inspeção Sanitária Federal. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Volume 32, pp. 645-648.

Marois, C., Oufour-Gesbert, F. & Kempf, I., 2000. Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, pp. 311-318.

Marois, C., Picault, J.-P., Kobisch, M. & Kempf, I., 2005. Experimental evidence of indirect transmission of *Mycoplasma synoviae*. *EDP Sciences*, Volume 36, pp. 759-769.

McMullin, P., 2004. *A Pocket Guide to Poultry Health and Disease*. s.l.:s.n.

Merial, S. A., s.d. *Profilax*. [Online]
Available at: <http://www.profilax.com.br/e-mail%20ROBERTO/MYCOVAX%20MS-H.pdf>
[Acedido em 3 maio 2014].

Minharro, S. et al., 2001. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, Volume 2, pp. 111-117.

Nagwa, A. S., Riham, H. H., Azza, S. M. A. E. & Mona, S. Z., 2013. Avian Mycoplasmosis. *Life Science Journal*, pp. 1014-1017.

Nascimento, E. R., Pereira, V. L. A., Nascimento, M. G. F. & Barreto, M. L., 2005. Avian Mycoplasmosis Update. *Brazilian Journal of Poultry Science*, pp. 1-9.

North, O. M., 1984. *Commercial Chicken Production Manual*. 3ª ed. Connecticut: AVI.

- OIE, 2013. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). Em: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. s.l.:s.n., pp. 482-496.
- Rodriguez, M. J. & Abad, J. C., 2001. *Deteccion de Mocoplasmas de Aves mediante ELISA-PCR*. s.l., s.n., pp. 249-249.
- Seahorn, H. & Hofacre, D. C., 2011. From the Diagnostic Lab: Mycoplasma Diagnostics at PDRC. *The Poultry Informed Professional*.
- Seifi, S. & Shirzad, M. R., 2012. Incidence and risk factors of *Mycoplasma synoviae* infection in broiler breeder farms of Iran. *Veterinary World*, pp. 265-268.
- Senties-Cué, G., Shivaprasad, H. L. & Chin, R. P., 2005. Systemic *Mycoplasma Synoviae* infection in broiler chickens. *Avian Pathology*, pp. 137-142.
- Sesti, L., s.d. *BIOSSEGURIDADE EM AVICULTURA: controle integrado de doenças*. [Online] Available at: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/biosseguridade_em_avicultura_controle_integrado_de_doencas_00fyh9f5g002wx5ok0pvo4k3glwvvh1.pdf [Acedido em 24 março 2014].
- Silva, R. d. C. F., 2011. *DESEMPENHO E QUALIDADE DE OVOS DE GALINHAS INFECTADAS POR Mycoplasma synoviae*. Niterói: Universidade Federal Fluminense.
- SPLabor, 2011. *Agar Base Micoplasma (Agar PPLO)*. [Online] Available at: <http://www.splabor.com.br/meios-de-cultura/meios-para-seletividade/agar-base-micoplasma-agar-pplo-modelo-m266.html> [Acedido em 18 fevereiro 2014].
- Stanley, W. A. et al., 2001. Monitoring *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* Infection in Breeder Chickens After Treatment with Enrofloxacin. *Avian Diseases*, Volume 45 No. 2, pp. 534-539.
- Venezie, I. Z. S. d., s.d. *Sampling Protocol and Conignment to the Laboratory for Successful Isolation of Poultry Mycoplasma Species*. s.l.:s.n.
- Xavier, J. et al., 2011. Seroprevalence of Salmonella and Mycoplasma infection in backyard chickens in the state of Entre Ríos in Argentina. *Poultry Science*, Volume 90, pp. 746-751.

Apêndices



Figura 1 Pavilhão com galinhas e galos de reprodução (a), com *slats*, ninhos (b) e sistema automático de recolha de ovos (c).



Figura 2 Receção de pintos para produção de frango (100 pintos/caixa) (a; b) em pavilhão com cama de casca de arroz (c).



Figura 3 Pavilhões de produção de frango (*Cobb* e/ou *Ross*). Pintos com um (a) e 12 (b) dias de vida e frangos com 38 dias de vida (c).

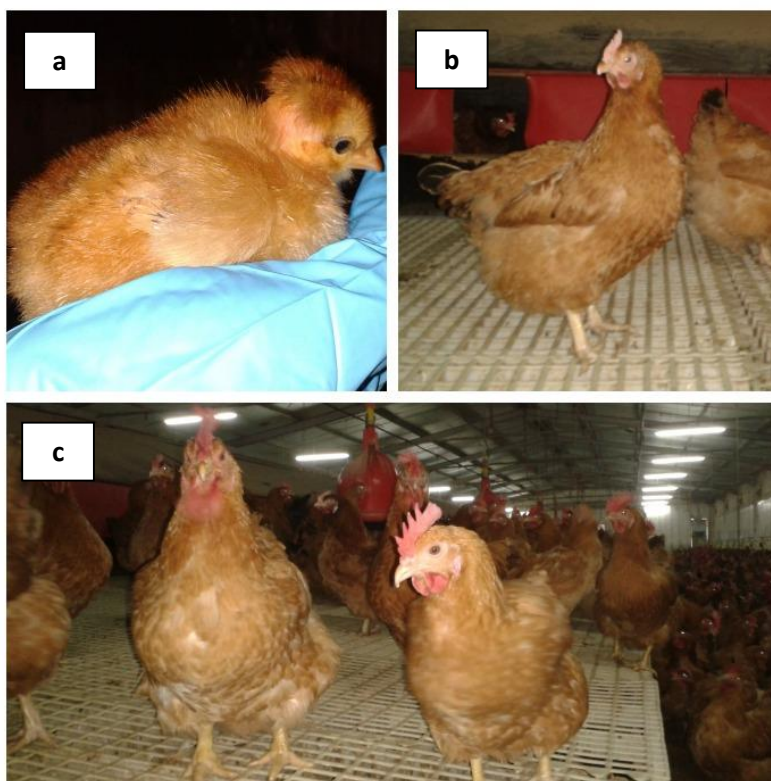


Figura 4 Pavilhões de frango (a) e galinhas reprodutoras (b, c) do campo (*Redbro Cou Nu*).



Figura 5 Bando de frangos do campo com tumefações nas articulações do tarso, compatíveis com infecção por *M. synoviae*.

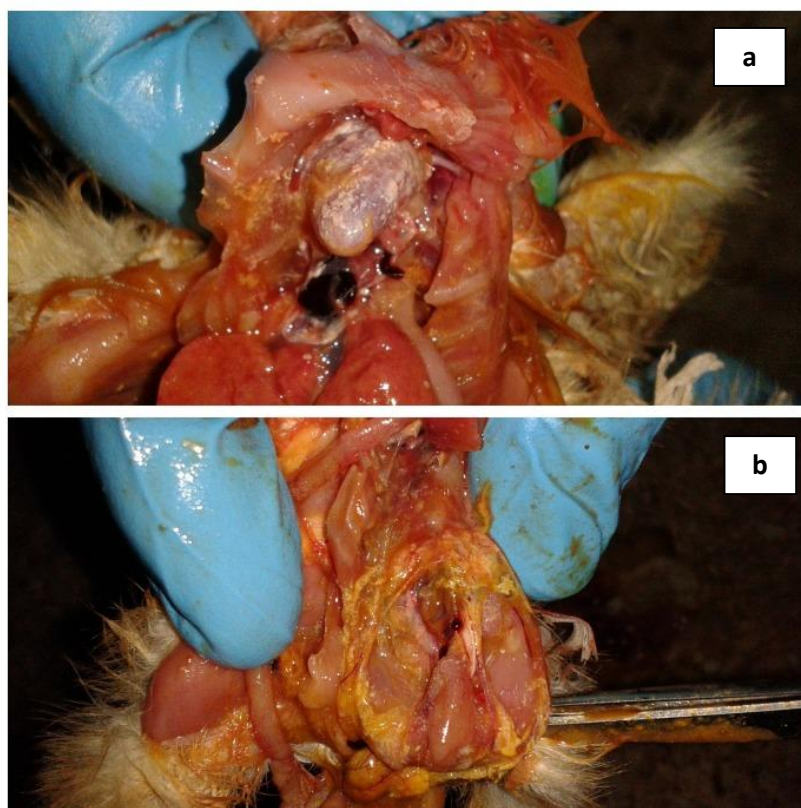


Figura 6 Frango com pericardite (a) e aerossaculite com fibrina (b), compatível com fase avançada de infecção por *M. synoviae*.

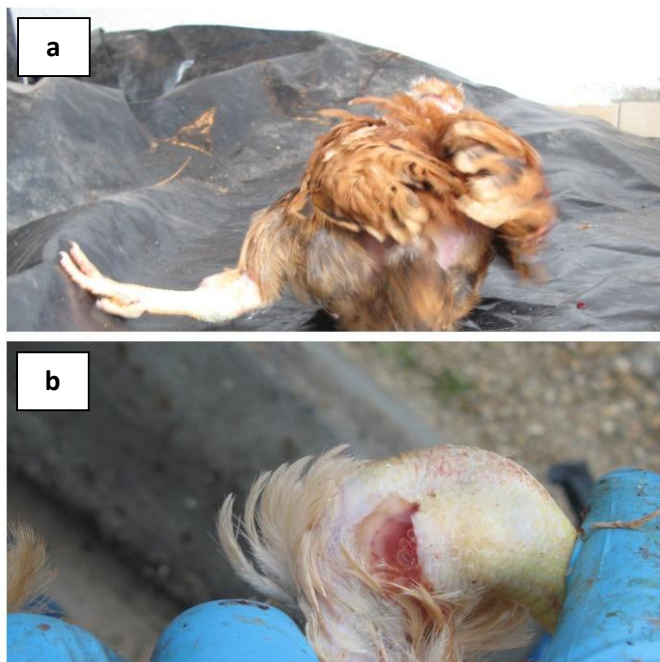


Figura 7 Frango do campo com tumefação da articulação do tarso (a) e sinovite (b), ambos compatíveis com infecção por *M. synoviae*.

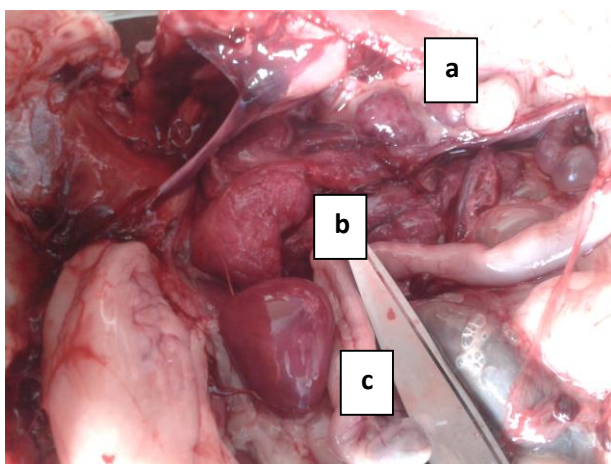


Figura 8 Frango com lesões compatíveis com infecção por *M. synoviae*. a - hipertrofia renal; b – ovarite; c - esplenomegalia.

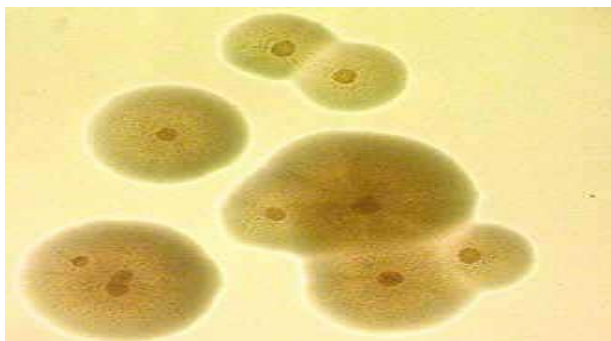


Figura 9 Colônias de micoplasma em forma de ovo estrelado (Corporation, s.d.).

Tabela I Sobrevivência de *M. synoviae* em diferentes materiais (Bradbury, s.d.; Abolnik & Gouws, 2014; Marois, et al., 2000).

Materiais	Tempo de sobrevivência de <i>M. synoviae</i>
Roupa (algodão)	4 dias (8 horas a 2 dias)
Nariz do homem	24 horas
Cabelo natural	8 horas
Cabelo artificial (extensões)	96 horas
Borracha	< 8 horas
Aparas de madeira	4 horas
Madeira	8 a 12 horas
Penas	> 2 a 3 dias

Tabela II Ordem de suscetibilidade de vias de infecção e o período de incubação correspondente, de aves infetadas experimentalmente por inoculação, entre as 3 e 6 semanas de idade, com exsudado de articulações de aves infetadas ou gema de embriões infetados (Kleven, 2003).

Ordem decrescente de suscetibilidades de vias de infecção	Período de incubação (dias)
Almofada plantar	2 a 10
Intravenoso	7 a 10
Intracranial	7 a 10
Intraperitoneal	7 a 14
Intrasinusal	14 a 20
Conjuntival	20

Tabela III Informações dos frangos testados (n=34).

Grupos de bandos	Bandos de frangos	Quantidade de frangos/bando	Anamnese/ S.C./ Lesões de necrópsia	Tratamentos
A	1	10 500	Sem patologia aparente	Sem antibioticoterapia
	2	20 000	Febre, heterogêneos, problemas locomotores	Enrofloxacina, doxicilina, tilosina (há 4 dias sem antibiótico)
	3	23 000	Espirros, heterogêneos	Trimetropin + Sulfatiazina, enrofloxacina, tilosina, amoxicilina
	4	16 000	Mortalidade elevada	Trimetropin + Sulfatiazina, enrofloxacina, amoxicilina
	5	16 500	Aerossaculite, espirros	Trimetropin + Sulfatiazina, doxicilina, lindomicina
	6	22 000	Tosse, hipertrofia coração, ascite	Trimetropin + Sulfatiazina, enrofloxacina, amoxicilina, tilosina
	7	7 800	Espirros	Trimetropin + Sulfatiazina
	8	6 000	Espirros, febre	Trimetropin + Sulfatiazina
	9	35 850	Diarreia aos 10 dias idade, espirros, aerossaculite	Amoxicilina
	10	33 300 (2x)	Espirros e aerossaculite no pavilhão 2	Sem antibioticoterapia

	11	20 000	Espirros, arrepiados, traqueíte com muco, aerossaculite, esplenomegalia, hipertrofia renal, sinovite no tarso com conteúdo amarelo, ovarite	Enrofloxacin, tilosina, lincomicina
B	12	10 000	s.i.	Doxicilina, enrofloxacin
	13	18300	Espumacidade moderada nos sacos aereos, hidropericárdio	Enrofloxacin, lincomicina
	14	35 000	s.i.	Amoxicilina, lincomicina
	15	35 000	Diarreia aos 10 dias de idade, espirros, aerossaculite	Amoxicilina, enrofloxacin
	16	30 000	Mortalidade elevada aos 7 dias de idade	Trimetropin+sulfadiazina, amoxilina, colistina
	17	33 966	s.i.	Ladoxyn, enrofloxacin
	18	34 272	s.i.	Enrofloxacin, doxicilina, tilosina
	19	23 000	Fezes com más absorções	Trimetropin+sulfadiazina, enrofloxacin
	20	3 800	s.i.	Trimetropin + Sulfatozina, enrofloxacin
C	21	24 000 (2x)	Heterogêneos, muito refugo	Enrofloxacin
	22	35 000	Diarreia com intestinos friáveis aos 10 dias de idade, aerossaculite ligeira, espirros	Amoxicilina, doxicilina + lincomicina
	23	15 000	Erosão moela, suspeita de doença Gumboro	Colistina, amoxicilina
	24	12 500	Fezes com más absorções	Trimetropin+sulfadiazina, enrofloxacin
	25	30 000	Espumacidade nos sacos aéreos durante todo o período de vida, ruídos respiratórios, mortalidades altas, conjuntivite	Enrofloxacin, tilosina, doxicilina, colistina
	26	2 900	s.i.	Trimetropin + Sulfatozina, enrofloxacin
	27	5 000	s.i.	Trimetropin+sulfadiazina, enrofloxacin
	28	11 000	Espirros, sinovite	Trimetropin+sulfadiazina, enrofloxacin (há 4 dias sem antibiotico)
	29	20 000	Traqueíte, sinovite, colisepticemia	Trimetropin+sulfadiazina, amoxicilina, doxicilina há 3 dias sem antibiotico
	30	17 000	s.i.	Trimetropin+sulfadiazina, doxicilina
	31	28 000	Ruidos respiratórios, ligeira espumacidade nos sacos aereos, sinovite	Enrofloxacin
	32	19 000	Problemas locomotores, sinovite	Colistina, tilosina, amoxicilina, doxicilina
	33	14 000	Problemas locomotores, sinovite	Colistina, enrofloxacin, amoxicilina, doxicilina
	34	19 000	Problemas locomotores, sinovite	Colistina, enrofloxacin, amoxicilina, doxicilina

S.i.- sem informação.

Tabela IV Informações do abate dos frangos (n=34).

Grupos de bandos	Bandos de frangos	Quantidade de frangos abatidos	Idade do abate (dias)	PM (kg)	TMA (%)	DAP	Inspeção Ante-Mortem	Frangos rejeitados/ patologia	Inspeção Post-Mortem					
									Artrite supurativa	Aerossaculite	Periepatite	Pericardite	Peritonite	Lesão fibrinopurulenta
A	1	3024	46	2,560	4,09	0	ok	13	2	0	0	0	0	0
	2	9324	39	1,435	2,74	0	ok	63	0	0	0	0	0	0
	3	6660	38	1.781	0.33	0	ok	21	0	0	0	0	0	0
	4	5832	32	1.437	4,56	1	ok	11	0	0	0	0	0	0
	5	3584	41	2.617	2.28	0	ok	306	0	21	0	0	0	0
	6	21470*	31*	1,315*	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
	7	5076	31	2,069	2,92	0	ok	8	0	0	0	0	0	0
	8	2016	39	2,411	0,46	1	ok	6	0	0	0	0	0	0
	9	23444	35	1,558	2,9	0	ok	233	0	0	0	45	45	0
	10	8000(1) 4000(2)	30(1) 36(2)	1,438(1) 1.917(2)	2,41(1) 3,46(2)	2(1) 0(2)	ok	20(1) 79(2)	0	0	8(2)	14(2)	9(2)	0
	11	6660	33	1,613	4,33	0	ok	101	0	0	15	15	0	0
B	12	4962	37	2,1	3,25	0	ok	19	0	0	3	2	0	0
	13	9720	33	1,716	1,68	0	ok	60	0	0	0	0	0	0
	14	3452	38	1,727	1,6	0	ok	12	0	0	0	0	0	0
	15	6660	34	1,544	2,31	2	ok	28	0	0	0	0	0	0
	16	9660	31	1,669	3,77	0	ok	72	0	9	0	0	0	0
	17	8000	30	1,473	2,36	0	ok	15	0	0	0	0	0	0
	18	8000	34	1,535	2,47	1	ok	23	0	0	0	0	0	0
	19	6660	33	1,535	1,58	2	ok	82	0	0	9	9	0	0
	20	3780	33	1,862	2,57	0	ok	61	0	0	19	13	0	0
C	21	6660	31	1,697(1) 1,703(2)	1,64(1) 1,11(2)	0	ok	32(1) 20(2)	0	0	0	0	0	0

22	18180	38	1,604	2,9	0	ok	663	0	0	46	48	68	68
23	5328	43	2,417	7,19	0	ok	22	0	0	2	3	0	1
24	2600	37	1,869	3,24	2	ok	16	0	0	0	0	0	0
25	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
26	2904	38	2,133	2,6	0	ok	23	0	0	0	0	0	0
27	4840	35	2,157	1,24	1	ok	20	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
28	4860	35	2,029	3,05	1	ok	18	0	0	0	0	0	0
29	19985*	31*	1,657*	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
30	6660	31	1,694	2,15	0	ok	22	0	0	0	0	0	0
31	26602*	42*	2,413*	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
32	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
33	14404*	81*	3,31*	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
34	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.

S.i.- sem informação; (1)- pavilhão 1; (2)- pavilhão 2; *- média de todos os abates.